

**UNIVERSIDAD DE PANAMA**  
**Vicerrectoria de Investigación y Postgrado**

**Facultad de Medicina**

**Maestría en Ciencias Biomédicas**

**Especialidad Inmunología**

**“Detección de portadores del Virus de Hepatitis B mediante la determinación de marcadores serológicos no rutinarios en los Bancos de Sangre y ADN de VHB en una muestra de donantes Anti HBc+ de la Republica de Panamá, año 2005 –2007”**

**Por**

**Licenciada Elianne Iriscellis Cano Molina**  
**Cédula 8-722-211**

**Directora**  
**Doctora Evelia Quiroz R**

**Trabajo de Graduación Presentado a la**  
**Universidad de Panamá como Requisito**  
**para optar por el Título de Magister**  
**en Ciencias Biomédicas con**  
**Especialización en Inmunología**

**Panamá, Republica de Panamá**  
**Noviembre, 2007**

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
Portada	I
Índice General	II
Índice de Tablas	VIII
Índice de Figuras	IX
Índice de Gráficos	X
Índice de Cuadros	XI
Índice de Fotos	XI
Agradecimientos	XII
Glosario de Términos y Abreviaturas	XIV
Resumen	XVI
Summary	XVII
Introducción	1
Justificación	4
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	5

## CAPÍTULO I

### GENERALIDADES

#### VIRUS DE LA HEPATITIS B

A.1 Antecedentes Históricos	6
A.2 Estructura Molecular del VHB	9

A 2 1 La familia hepadnaviridae	9
A 2 2 Estructura y Genoma del VHB	10
A 2 3 Transcripción y Producción de Antígenos Proteicos	13
A 2 3 1 Región de los genes Pre-S1 Pre-S2 y S	13
A.2 3 2 Región del C Pre- C	14
A 2 3 3 Región del gen P	14
A.2 3 4 Región del gen X	14
A 2 4 Antígenos Proteicos del VHB	15
A 2 4 1 Antígeno de superficie (HBsAg)	15
A 2 4 2 Antígeno de la capsida (HBcAg)	15
A 2 4 3 Antígeno e (HBeAg)	16
A 2 4 4 Antígeno x (HBxAg)	16
A 3 REPLICACIÓN DEL VHB	17
A 3 1 Unión del VHB al Hepatocito	17
A.3 2 Las Partículas Virales Séricas	19
A 4 VARIANTES DEL VHB	21
A 4 1 Variantes defectuosas Pre – C	22
A 4 2 Variantes defectuosas a (de envoltura o escape)	22
A 4 3 Mutaciones en el gen X	23
A 4 4 VHB tipo 2	23
A 4 5 Variantes del VHB con expresión anómala de los	
Determinantes antígenicos de subtipo	24
A 5 GENOTIPOS DEL VIRUS DE HEPATITIS B	24
A 5 1 Distribución geográfica	24
A 5 2 Relación del genotipo del VHB con la severidad de la enfermedad	25

<b>MODOS DE TRANSMISION DEL VHB</b>	<b>27</b>
<b>B 1 Grupos con mayor riesgo de infeccion por VHB</b>	<b>28</b>
<b>B 2 Transmisi3n de VHB por Transfusi3n Sanguinea</b>	<b>28</b>
B 2 1 Seroprevalencia de VHB en donantes de los Bancos de Sangre De la Republica de Panama	29
B 2 2 Manejo de los donantes positivos por HBsAg y anti HBc en los Bancos de Sangre del pais	33
<b>PATOGENESIS Y COMPLICACIONES</b>	<b>34</b>
<b>C 1 Infeccion Aguda</b>	<b>35</b>
<b>C 2 Infeccion cronica</b>	<b>36</b>
<b>C 3 Complicaciones</b>	<b>40</b>
C 3 1 Enfermedad Hepática Cronica (CLD)	40
C 3 2 Hepatocarcinoma (HCC)	40
C 3 2 1 Investigaci3n para el carcinoma hepatocelular	43
<b>DIAGN3STICO DE LABORATORIO</b>	<b>44</b>
<b>D 1 Pruebas quimicas</b>	<b>44</b>
<b>D 2 Pruebas Serologicas</b>	<b>44</b>
D 2 1 Tecnicas disponibles para la detecci3n de Ag y Ac de VHB	44
D 2 1 1 Prueba de ELISA convencional	44
D 2 1 2 Principio de Quimioluminiscencia Amplificada	47
D 2 2 Marcadores Serol3gicos	50
D 2 2 1 Antigeno de Superficie (HBsAg)	50
D 2 2 2 Antigeno de la capsida (HBcAg)	51
D 2 2 3 Anticuerpo anti HBc	51
D 2 2 4 Antigeno e (HBeAg)	52



D 2 2 5 Anticuerpo anti HBe	52
D 2 2 6 Anticuerpo anti HBs	53
D 3 Pruebas Moleculares	56
D 3 1 Determinación de ADN del virus de la Hepatitis B (VHB DNA)	56
D 3 1 1 Técnica de PCR	56
D 3 1 2 Nested PCR	57
D 3 1 3 Carga Virica	59
D 3 1 3 1 Análisis Cuantitativo Automatizado de HBV	
DNA Usando Cobas Amplicor HBV Monitor Test	60
D 3 1 3 2 Principios Generales de la Prueba Cobas	
Amplicor	60
E RESPUESTA INMUNOLÓGICA A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE HEPATITIS B	62
E 1 VHB y Citoquinas	64
F TRATAMIENTO	67
F 1 Indicaciones para el Tratamiento de Pacientes con Hepatitis B crónica	68
F 2 Drogas aprobadas por la FDA para el tratamiento de la Infección	
Cronica por VHB	69
F 2 1 Interferón ALFA 2b (IFN alfa 2b) (Intron A)	69
F 2 2 Lamivudine (Epivir)	70
F 2 3 Adefovir dipivoxil (Hepsera)	72
F 2 4 Pegasys	73
F 2 5 Tratamiento con Citoquinas	73
G PREVENCIÓN PROFILAXIS Y VACUNA CONTRA EL VHB	74
G 1 Vacuna contra el VHB	75

**H EPIDEMIOLOGIA**

78

**CAPITULO II****MATERIALES Y METODOS**

<b>A</b>	<b>Material Necesario para Captación del Donante para Toma y Envio de Muestras</b>	<b>80</b>
<b>B</b>	<b>Material Necesario para el Procesamiento de las Muestras Anti HBc Positivas</b>	<b>80</b>
<b>B 1</b>	<b>Fase Serologica</b>	<b>80</b>
<b>B 1 1</b>	<b>Materiales</b>	<b>80</b>
<b>B 1 2</b>	<b>Equipos de la Fase Serologica</b>	<b>81</b>
<b>B 2</b>	<b>Fase Molecular</b>	<b>81</b>
<b>B 2 1</b>	<b>Reactivos</b>	<b>81</b>
<b>B 2 3</b>	<b>Materiales</b>	<b>82</b>
<b>B 2 4</b>	<b>Equipos</b>	<b>84</b>
<b>C</b>	<b>Preparación de Soluciones</b>	<b>84</b>
<b>C 1</b>	<b>Tampón TBE 0.5X</b>	<b>85</b>
<b>C 2</b>	<b>Gel de Agarosa 2%</b>	<b>85</b>
<b>D</b>	<b>Metodologia</b>	<b>85</b>
<b>D 1</b>	<b>Fase de Muestreo</b>	<b>85</b>
<b>D 1 1</b>	<b>Universo de Estudio</b>	<b>85</b>
<b>D 1 2</b>	<b>Calculo de la Muestra</b>	<b>85</b>
<b>D 1 3</b>	<b>Procedencia de la Muestra</b>	<b>85</b>
<b>D 1 4</b>	<b>Recoleccion de Datos</b>	<b>86</b>
<b>D 1 5</b>	<b>Toma de Muestra</b>	<b>86</b>
<b>D 1 6</b>	<b>Criterios de Inclusion</b>	<b>86</b>

D 1 7 Criterios de Exclusion	87
D 2 Fase Serológica	87
D 2 1 Pruebas Serológicas	87
D 3 Fase Molecular	89
D 3 1 Extracción de ADN para PCR y Nested PCR	89
D 3 2 Lisis de Celulas	89
D 3 3 Precipitación de Proteinas	90
D 3 4 Precipitacion de ADN	90
D 3 5 Hidratación del ADN	91
D 3 6 Amplificación del ADN	91
D 3 6 1 Verificación de la presencia de ADN utilizando un Housekeeping gene	91
D 3 6 2 Protocolo de Amplificación para PCR y Nested PCR	94
D 3 7 Deteccion de Productos Amplificados	96
D 3 7 1 Electroforesis en Gel de Agarosa	96
D 3 7 2 Armado de la Camara de Electroforesis	96
D 3 7 3 Colocacion de las muestras en el gel de agarosa y Electroforesis	97
D 3 8 Análisis Cuantitativo de las Muestras Positivas por PCR y Nested PCR mediante la prueba Cobas Amplicor HBV Monitor	98
D 3 8 1 Calculo de los Resultados del Analisis Cuantitativo de ADN de VHB	101

<b>A. Resultados de la Fase de Muestreo</b>	<b>103</b>
B 1 Determinacion del marcador HBeAg	116
B 2 Determinacion del marcador anti HBe	117
B 3 Determinacion de marcador anti HBs	117
B 4 Determinación del marcador HBsAg	117
B 5 Determinación del marcador anti HBc IgM	118
<b>C Resultados de la Fase Molecular</b>	<b>119</b>
C 1 Estandarizacion de la PCR y Nested PCR con controles positivos conocidos	119
C 1 2 Resultados obtenidos mediante la técnica de PCR y Nested PCR para los donantes confirmados	120
C 1 3 Resultados obtenidos mediante la tecnica de PCR y Nested PCR para los donantes confirmados	124
<b>D Discusion</b>	<b>126</b>

### INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Prevalencia de Anti HBc en los Bancos de Sangre estatales y privados de la Red Nacional de Laboratorios y Bancos de Sangre	29
Tabla 2 Numero de Donaciones Realizadas en todo el pais y Numero de Unidades Anti HBc positivas por costo % de seroprevalencia de Anti HBc segun año	30
Tabla 3 Numero de Donantes Atendidos y Porcentaje de Anti HBc+ segun año y Banco de Sangre	31
Tabla 4 Reactivos Necesarios para el equipo Vitros Eci en la Fase Serológica del Estudio	Anexos
Tabla 5 Interpretación de las Pruebas para el VHB	55

Tabla 6	Numero de Donantes Encuestados, segun Banco de Sangre y Provincia	103
Tabla 7	Numero de Donantes Encuestados segun Rango de Edad y sexo	104
Tabla 8	Frecuencia y Porcentaje de la Población Encuestadas segun Nivel Escolar y Sexo	106
Tabla 9	Numero de Donantes Encuestados segun Estado Civil	107
Tabla 10	Distribucion de Donantes Encuestados segun la variable Más de una Pareja Habitual	107
Tabla 11	Distribucion de Donantes Encuestados segun el Tipo de Donación	109
Tabla 12	Distribucion de Donantes Encuestados segun Ocupación	110
Tabla 13	Distribución de Donantes Encuestados segun Hábitos Sexuales	112
Tabla 14	Distribucion de Donantes Encuestados segun Episodio de Ictericia	112
Tabla 15	Distribucion de Donantes Encuestados segun Dosis de Vacuna de VHB	113
Tabla 16	Donantes anti HBc positivos e Indeterminados segun Banco de Sangre	114
Tabla 17	Resumen de Datos de Anti HBc Positivos	114
Tabla 18	Numero de Donantes analizados en la Fase Serológica	116
Tabla 19	Resultados de las Pruebas Serologicas	116
Tabla 20	Resultados de los Marcadores Serológicos de los Controles Positivos	119
Tabla 21	Comparación de Resultados de Nested PCR y Marcadores Serologicos	125
Tabla 22	Resumen de Resultados de Carga Virica de VHB	126

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1 Estructura del VHB	10
Figura 2 Diagrama del Genoma del VHB	12

<b>Figura 3 Ciclo de Replicacion del VHB</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4 Microfotografía Electronica de las Particulas Virales</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5 Diagrama de Manejo de Muestras anti HBc y HBsAg positivas en los Bancos de Sangre de Panamá</b>	<b>34</b>
<b>Figura 6a y 6b Esquema que explica dos formas de Infeccion cronica por VHB</b>	<b>38</b>
<b>Figura 7 Historia Natural de la Infección por VHB en adultos</b>	<b>39</b>
<b>Figura 8 Interaccion del HBxAg con factores de transcripcion que contribuye al desarrollo del Hepatocarcinoma</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9 Describe en parte la Reacción de Quimioluminiscencia Amplificada</b>	<b>49</b>
<b>Figura 10 Describe la aparición de los distintos marcadores serológicos durante</b>	<b>54</b>
<b>Figura 11 Explica la amplificacion en PCR Anidada o Nested PCR</b>	<b>58</b>
<b>Figura 12 Distribución geográfica de la Infección Crónica por VHB</b>	<b>79</b>
<b>Figura 13 Perfil Serológico del 75 85% de pacientes infectados con VHB</b>	<b>118</b>

## **INDICE DE GRAFICOS**

	<b>Página</b>
<b>Gráfico 1</b>	<b>29a</b>
<b>Grafico 2</b>	<b>104</b>
<b>Gráfico 3</b>	<b>105</b>
<b>Gráfico 4</b>	<b>105</b>
<b>Grafico 5</b>	<b>106</b>
<b>Grafico 6</b>	<b>108</b>
<b>Gráfico 7</b>	<b>108</b>
<b>Gráfico 8</b>	<b>109</b>
<b>Gráfico 9</b>	<b>110</b>
<b>Gráfico 10</b>	<b>111</b>

<b>Grafico 11</b>	<b>111</b>
<b>Gráfico 12</b>	<b>113</b>
<b>Gráfico 13</b>	<b>115</b>
<b>Gráfico 14</b>	<b>116</b>

## **INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro No 1</b>	<b>94</b>
<b>Cuadro No 2</b>	<b>95</b>

## **INDICE DE FOTOS**

	<b>Página</b>
<b>Foto No 1</b>	<b>92</b>
<b>Foto No 2</b>	<b>120</b>
<b>Foto No 3</b>	<b>120</b>
<b>Foto No 4</b>	<b>122</b>
<b>Foto No 5</b>	<b>123</b>
<b>Foto No 6</b>	<b>124</b>

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>142</b>
---------------------	------------

<b>ANEXOS</b>	<b>150</b>
---------------	------------

## **AGRADECIMIENTOS**

### **PERSONALES**

. DIOS Y A LA VIRGEN SANTÍSIMA

. MI FAMILIA

. LOS QUE ME AYUDARON APOYARON Y CONFIARON AUN SIN CONOCERME Y CON QUIENES  
HORA TENGO UNA GRAN AMISTAD

### **RESUPUESTO y APROBACIÓN DEL PROYECTO**

Dr. Jorge Motta, Director del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

Comisión Nacional de Bioética del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

Comisión Científica y Técnica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

Licda. Elvira de Austin, Directora del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública

### **ATROCINADORES**

Lic. Víctor Manuel Peralta Escudero Gerente Regional para Panamá y Centroamérica de la Línea de Productos  
Ortho Clinical Diagnostics de Johnson & Johnson y todo su Equipo de Colaboradores

Lic. Edgardo Lau, Gerente de SERVILAB

Lic. Iris Gutierrez, Representante de Ventas de Roche Diagnostics en la Compañía Quimifar S.A.

### **COLECCIÓN DE DATOS EN LOS BANCOS DE SANGRE**

Lic. Rosa Vergara Coordinadora Regional de los Laboratorios de Bocas del Toro por parte de la Caja de Seguro  
Social y Jefa Técnica del Banco de Sangre del Hospital de Changuinola

Lic. Xiomara de Jiménez, jefa técnica del Banco de Sangre del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía

Lic. Inés Reyes, jefa técnica del Banco de Sangre del Hospital Rafael Hernández

Lic. Aldo Velásquez, jefe técnico del Banco de Sangre del Hospital Manuel Amador Guerrero

Lic. Cecilia Fong jefa técnica del Banco de Sangre del Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias  
Madrid

Lic. Gilma Bósquez, jefa técnica del Banco de Sangre del Hospital Santo Tomás



SESORES TÉCNICOS Y COLABORADORES

ra. Evelia Quiróz (Directora del Proyecto/ U de Panamá)

ic Omar Espinosa (Laboratorio de Genética/CHMAAM)

ic Juan Carlos Pinto Estrada (Banco de Sangre/CHMAAM)

ic Ricardo Correa (INDICASAT/SENACYT)

ic José Guillermo Aguirre Representante de Ventas de Roche Diagnostics, en la Compañía Quimifar S A,  
specialista en la Línea de Biología Molecular

ir Moisés Espino (Sección de Pruebas Especiales /CHMAAM)

ic Johana e Itzel de la Sección de Pruebas Especiales/CHMAAM.

Compañeros de la Sección de Inmunoserología (Licdos Cirilo Edda y Blanco)

*Después de esperar tanto un día como cualquier otro decidí triunfar*

*Decidí no esperar las oportunidades sino buscarlas*

*Decidí ver cada problema como la oportunidad de encontrar una solución*

*Decidí ver cada desierto como la oportunidad de encontrar un oasis*

*Decidí cada noche como un misterio a resolver*

*Decidí ver cada día como una oportunidad de ser feliz*

*¡que! día descubrí que mi único rival son mis propias debilidades y que en ellas se encuentran la mejor  
orma de superarme Dejé de temer perder y empecé a temer no ganar*

*Descubrí que no era la mejor y que quizás nunca lo fui*

*Se dejó de importar quién ganara o perdiera ahora me importa simplemente saberme mejor que ayer*

*¡prendí que lo difícil no es llegar a la cima sino jamás dejar de subir*

*Shanne*

**GRACIAS A TODOS POR AYUDARME A SUBIR'**

## GLOSARIO DE TERMINOS Y ABREVIATURAS

- 1 **AASLD** Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades del Hígado
- 2 **ALT** Alanina aminotransaminasa
- 3 **Anti HBc** anticuerpo contra el antígeno core del virus de hepatitis B
- 4 **Anti-HBe** anticuerpo contra el antígeno e del virus de hepatitis B
- 5 **Anti HBs** anticuerpo contra el antígeno de superficie del virus de hepatitis B
- 6 **Anti HBc IgM** anticuerpos IgM contra el antígeno core del virus de hepatitis B
- 7 **AST** aspartato aminotransaminasa.
- 8 **CD** Cluster of Differentiation
- 9 **CDC** Centro para el Control de Enfermedades
- 10 **cccDNA** DNA circular cerrado covalentemente
- 11 **CLD** (chronic liver disease) enfermedad crónica del hígado
- 12 **dNTPs** dinucleótidos dATP (adenosina trifosfato) dGTP (guanina trifosfato) dCTP (citocina trifosfato) dTTP (timina trifosfato)
- 13 **DNA ó ADN (Desoxynucleic acid )** ácido desoxirribonucleico
- 14 **DHBV** virus de hepatitis del pato pequeño
- 15 **ELISA** Ensayo inmunoenzimático
- 16 **ETS** Enfermedad de transmisión sexual
- 17 **FDA** (Foods and Drugs Administration) Administración de Drogas y alimentos.
- 18 **GAPDH** gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
- 19 **Gen reportero** Gen que está presente en las células de mamíferos y cuya amplificación por PCR permite reconocer la presencia de DNA en extractos
- 20 **Gp** glicoproteína
- 21 **GSHV** ground squirrel hepatitis virus virus de la hepatitis de la ardilla.
- 22 **HBcAg** Antígeno core del VHB
- 23 **HBeAg** Antígeno e del VHB

- 24 HBsAg** Antígeno de superficie del VHB
- 25 HBxAg** Antígeno x del VHB
- 26 HBV DNA** DNA del Virus de Hepatitis B
- 27 HCC** hepatocarcinoma
- 28 HHBV** virus de hepatitis de la garza real
- 29 HSH** Hombres que tienen sexo con hombres
- 30 IFN alfa 2b** interferon alfa 2 beta
- 31 IFN- $\gamma$**  interferon gama
- 32 IL** interleuquina
- 33 ICGES-LCRSP** Laboratorio Central de Referencia en Salud Publica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
- 34 MHBS** proteina mediana de la cubierta
- 35 OMS** organizacion Mundial de la Salud
- 36 ORF** open reading frame marco de lectura abierto
- 37 PCR.** polimerase chain reaction Reacción en Cadena de la Polimerasa
- 38 Poliarteritis Nodosa** enfermedad del tejido conectivo que causa la inflamación de arterias pequeñas y medianas disminuyendo el aporte de sangre a los tejidos alimentados por estos vasos
- 39 Nested PCR** PCR anidada
- 40 RNA o ARN** acido ribonucleico
- 41 SHBS** proteina mayor de la cubierta del antígeno de superficie
- 42 SVE** sistema de vigilancia epidemiológica.
- 43 Th1/ Th2** linfocito T ayudador de estirpe 1 y 2
- 44 TNF  $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral alfa
- 45 TNF  $\beta$**  factor de necrosis tumoral beta
- 46 VHB** virus de hepatitis B
- 47 VIH** virus de inmunodeficiencia humana

## RESUMEN

**Introducción** El VHB es el agente causal de la hepatitis B. El virus tiene en su estructura, antígenos como el "core" para el cual se desarrollan anticuerpos que pueden ser detectados a través de pruebas de tamizaje serológicas. La prueba de Anti HBc se realiza en los Bancos de Sangre como prueba de tamizaje para unidades donadas. La seroprevalencia promedio desde el año 2003-2006 para este marcador es de 3.21% lo que ha representado un costo aproximado de 325 728.00 en unidades descartadas. Los porcentajes de seroprevalencias difieren entre regiones diferentes del país; se destaca la región de Changuinola con la mayor seroprevalencia con promedio de 15% (años 2003-2006).

**Objetivo General** Demostrar la importancia de la detección de portadores del VHB mediante la determinación de marcadores serológicos no rutinarios, y su correlación con la presencia de HBV DNA, en una muestra de donantes anti HBc positivos de seis Bancos de Sangre de la República de Panamá.

**Metodología** Entre el mes de octubre de 2005 y agosto de 2007 se encuestaron y se tomaron muestras de sangre de 339 donantes de cinco Bancos de Sangre de la República de Panamá. Las encuestas y muestras fueron enviadas al ICGES LCRSP para su confirmación por Anti-HBc y para evaluarlas con marcadores serológicos no rutinarios en los Bancos de Sangre, como el Anti HBs, Anti HBe y HBeAg, con el método de quimioluminiscencia amplificada, además se determinó si había presencia de ADN de VHB por medio de Nested PCR y la carga viral por medio del Kit Monitor Test para VHB. Las respuestas de los donantes fueron tabuladas en el programa Excell.

**Resultados** De la información epidemiológica se obtuvo que el 93% eran hombres, 91% de las donaciones eran de reposición, el 5.8% (20/339) dijeron tener más de una pareja habitual, 13.8% (47/339) admitieron consumo de alcohol frecuente y 91.4% no tenían ninguna dosis de vacuna para VHB. La variable Más de una Pareja Habitual se relacionó estadísticamente con el alto número de unidades Anti HBc+ ( $p < 0.05$ ). De los 339 donantes, 31 fueron confirmadas Anti HBc+. De los 31 confirmados Anti HBc+ el 64.5% tenían niveles de Anti-HBs  $> 20$  mUI/ml, 39.05% niveles de anti HBs  $< 10$  mUI/ml, 6.45% (2 muestras) no pudieron ser confirmadas. Para el marcador Anti HBe 41.9% (13/31) fueron positivos y sólo 1 fue HBeAg+. De las 20 muestras analizadas por Nested PCR para buscar ADN de VHB, cinco (2 anti HBc-/HBsAg+ y 3 anti HBc-/HBsAg-) fueron positivas, y a su vez se determinó la carga viral. Sólo 1 muestra Anti HBc+/HBsAg+ resultó con carga viral detectable.

**Conclusiones** Este estudio confirma que aun en ausencia del marcador HBsAg en la unidad donada existe la presencia de ADN del VHB en el suero de donantes anti HBc+. El 70.9% de los donantes anti HBc+ tenían niveles de Anti HBs entre 8.1 mUI/ml y 92.300 mIU/ml, este marcador permite el seguimiento epidemiológico del donante. Se evidenció estadísticamente la relación que existe entre el comportamiento social de los donantes y el alto número de unidades anti HBc positivas, a través de la información epidemiológica obtenida de los donantes.

## SUMMARY

**Introduction** The HBV is the causative agent of hepatitis B. The virus takes its structure, antigens as the core for which it was developed antibodies can be detected by serological screening. The test Anti HBc takes place in the Blood Banks for screening donated units. The seroprevalence average from the year 2003-2006 for this marker is 3.21% which represented an approximate cost of \$ 325 728.00 in units discarded. The seroprevalence rates differ between different regions of the country. Highlights the Changuinola region with the highest prevalence, with an average of 15% (years 2003-2006).

**General Objective** To demonstrate the importance of the detection of HBV carriers by identifying non routine serological markers and its correlation with the presence of HBV DNA, in a sample of donors anti HB core positive six of Blood Banks Republic of Panama.

**Methods** Between October 2005 and August 2007 was surveyed and took blood samples from 39 donors in five of Blood Banks of the Republic of Panama. Surveys and samples were sent to CGES LCRSP for confirmation by Anti HBc and to assess them with non routine serological markers in the blood banks such as the Anti HBs, Anti-HBe and HBeAg, with the method of amplified quimioluminescence plus it was determined whether they had presence of HBV DNA through Nested PCR and viral load through the Monitor Test Kit for HBV. The responses from donors were tabulated in the Excell program.

**Results** Of the surveys were obtained that 93% were men, 91% of the donations were of replenishment. 5.8% (20/339) said to have more than a couple usual. 13.8% (47/339) admitted alcohol frequent, and 91.4% had no doses of vaccine for HBV. The variable Over a couple common statistically related to the high number of units Anti HBc + ( $p < 0.05$ ). Of the 339 donors 31 were confirmed. Of the 31 confirmed Anti-HBc + 64.5% had levels of Anti HBs > 20 mIU / ml, 39.05% has Anti HBs levels < 10 mIU / ml. 6.45% (2 samples could not be confirmed). For the serological marker Anti HBe 41.9% (13/31) were positive and 3.2% (1 / 31) was HBeAg +. A total of 20 samples (15 Anti HBc + and 5 Anti-HBc-) were analyzed by Nested PCR to look for HBV DNA. Five (2 anti HBc-/HBsAg + and 3 anti-HBc-/HBsAg -) were positive in turn to identified the viral load for these five samples only 1 (Anti HBc + / HBsAg +) was with detectable viral load.

**Conclusions** This study confirms that even in absence of HBsAg in donated units exists the presence of HBV DNA in the serum of Anti HBc + donor. The 70.9% of the donors have Anti HBs levels between 8.1 mIU / ml and 92 300 mIU / ml this marker allows epidemiological follow up to the donor. It was confirmed statistically the relationship that exist between sexual behavior of donors and the high number of Anti HBc+ units through the epidemiological information obtained from donors.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la Hepatitis B (VHB) es el agente causal de la hepatitis B enfermedad que genera severos daños a nivel hepático y que puede ser adquirida mediante la transfusión de sangre y hemoderivados que tengan el virus por transmisión sexual perinatal y exposición laboral en el caso de los trabajadores de la salud

La hepatitis B es una enfermedad antigua, sin embargo la mayoría de los avances en el conocimiento de su epidemiología, prevención, patogénesis y tratamiento se han realizado en los últimos años. La expectativa de erradicación global dentro de los próximos 50 años es tecnológicamente posible pero la implementación de su vacunación a nivel mundial requerirá significativamente más tiempo para superar las barreras sociales y económicas existentes. Se tiene un optimismo razonable para que la infección por el VHB sea erradicada, pero existen más de 300 millones de portadores a nivel mundial que están en riesgo de morir por falla hepática o carcinoma hepatocelular y los nuevos casos de infección por VHB continuarán aumentando por muchos años más. Estas consideraciones indican que la infección por VHB no puede ser considerada como un problema de salud del pasado.

La prevención de esta enfermedad transmitida por transfusión es uno de los objetivos primordiales de la práctica actual en la medicina transfusional. Para cumplir con ese objetivo se realizan pruebas de tamizaje para antígenos y anticuerpos específicos del VHB.

Este trabajo intenta evaluar la importancia de la determinación de otros marcadores serológicos como el *anti HBe* *anti HBs* *HBeAg* y del ADN pro viral en muestras de suero de donantes *anti HBc positivos* de la República de Panamá

Para este estudio se eligieron 6 Bancos de Sangre de acuerdo a las seroprevalencias de unidades anti HBc positivas que presentaban en la estadística del año 2003

Esta investigación suministrará información reciente sobre el riesgo de transmisión del VHB en una donación y permitirá al SVE dar seguimiento educación y tratamiento a los donantes detectados como portadores controlando así las donaciones a futuro

Los métodos y procedimientos para la obtención de los resultados serán los que indiquen las pruebas comerciales Para realizar la detección del ADN VHB en suero se estandarizará una PCR anidada con dos juegos de primers o cebadores Adicionalmente se determinará la carga viral en diferentes muestras a fin de relacionar la presencia de este ADN viral con los patrones serológicos obtenidos previamente

#### • Planteamiento del problema

Los Bancos de Sangre de la República de Panamá realizan la determinación de anti HBc como prueba para seleccionar las unidades de sangre que van a ser donadas Aquellas que resultan positivas son descartadas y las muestras de suero de esos donantes son enviadas al ICGES LCRSP para su confirmación Esta pérdida de unidades representa un elevado costo para el estado ya que cada unidad de sangre tiene un valor de \$58 00 en hospitales públicos y aproximadamente \$200 00 en el área privada Esta determinación al resultar positiva en los donantes puede tener cuatro interpretaciones establecidas por el CDC (Ver Tabla 5) una de ellas plantea la posibilidad que se trate de una infección por VHB

en el pasado por ello es importante determinar otros marcadores serologicos y la presencia de ADN pro viral particularmente si el marcador del antígeno de superficie (HBsAg) esta negativo como ocurre en la mayoría de los donantes ya que podrian ser portadores asintomaticos transmisores del VHB

Actualmente solo un grupo de donantes son reportados al SVE para seguimiento medico los agudos o HBsAg positivos Aquellos anti HBc positivos no son reportados debido a las dificultades para darles seguimiento En el ICGES LCRSP se reciben aproximadamente 100 sueros de donantes anti HBc positivos de los Bancos de Sangre a nivel nacional por mes (Articulo # 17 Capitulo II, De la Garantia de Calidad y Bioseguridad Reglamento de los Bancos de Sangre serologia que resulte positiva debe ser confirmada en el Laboratorio Central de Referencia )

La seroprevalencia de donantes anti HBc positivos ha sido la seroprevalencia mas alta de todos los agentes infecciosos que se realizan en los Bancos de Sangre desde que se inicio su determinacion en el año 2000 Si a estos donantes se les realizaran como parte del algoritmo de tamizaje otros marcadores como el anti HBe o el anti HBs y resultaran positivos con otros marcadores negativos se podria decir con mayor seguridad que este donante tuvo contacto con el virus pero es un donante de buen pronóstico e inmunizado respectivamente El donante anti HBcore positivo debe considerarse como un portador de virus potencialmente infeccioso y con un riesgo elevado de desarrollar una patologia hepatica, si no se conocen otros marcadores La negatividad del anti HBs y el anti HBe indicara al medico que el donante debe recibir seguimiento y vacunación

Este trabajo intenta evaluar la importancia que tiene la determinación de otros marcadores serológicos no tradicionales y la presencia del virus en las donaciones de



sangre y la necesidad de dar seguimiento epidemiológico a estos casos contribuyendo así con la disminución de la transmisión del VHB

#### • Justificación

Durante los últimos años se ha notado un incremento en el número de donantes positivos por anti HBc lo que repercute en un problema de salud pública debido a que se disminuye el número de unidades “viables” para la transfusión y encarece el costo de la donación. Pese a ese comportamiento no se ha determinado la seroprevalencia de donantes portadores del VHB entre los anti HBc positivos de la población panameña. Por ello este estudio pretende hacer un muestreo en seis Bancos de Sangre de la República, a fin de generar información que sirva de apoyo al SVE en cuanto al número de donantes que son anti HBc positivos y que además presentan otros marcadores serológicos y la presencia de ADN VHB.

Los resultados obtenidos en este estudio permitirán mejorar tanto el algoritmo existente en el ICGES LCRSP para determinar la hepatitis B en donantes y pacientes como el conocimiento de los portadores asintomáticos su seguimiento médico y educación.

El seguimiento por parte del SVE debe contemplar la inclusión de estos donantes en el grupo de ‘Donantes Difendidos Permanentes’ ya que controlará que no sigan donando en ningún Banco de Sangre del país.

### **OBJETIVO GENERAL**

- Demostrar la importancia de la detección de portadores del VHB mediante la determinación de marcadores serológicos no rutinarios y su correlación con la presencia de ADN VHB en una muestra de donantes anti HB core positivos de seis Bancos de Sangre de la República de Panamá

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Realizar pruebas serológicas no rutinarias para la determinación de la condición de portador y niveles de inmunidad frente al VHB en los donantes
- Mejorar en donantes el algoritmo existente para el tamizaje serológico de VHB
- Detectar portadores asintomáticos del VHB mediante la detección del ADN VHB en los donantes anti HBcore positivos
- Determinar en la población de donantes encuestados el número de inmunizados con la vacuna de VHB mediante la información obtenida a través del Formulario de Recolección de Datos
- Correlacionar los resultados de los marcadores serológicos evaluados con la información epidemiológica de los donantes incorporados al estudio
- Correlacionar estos marcadores serológicos con la presencia de ADN de VHB y carga viral de ADN de VHB circulante

## **CAPITULO I**

### **GENERALIDADES**

#### **A VIRUS DE LA HEPATITIS B**

##### **A.1 Antecedentes Históricos**

La historia del descubrimiento del virus de Hepatitis B es reciente comienza en 1957 en la Universidad de Oxford cuando Anthony Allison y Baruch S. Blumberg observan diferencias comunes heredadas en proteínas séricas humanas y animales las variantes polimórficas en las proteínas se evidenciaban con pequeñas diferencias de movilidad en la recién inventada electroforesis en gel de almidón. Estudiaron la distribución de las variantes polimórficas y descubrieron muchas que eran desconocidas.

En 1960 razonaron que al haber mucho polimorfismo en las proteínas séricas algunos podían ser antígenicos y los pacientes que recibían muchas transfusiones podían desarrollar anticuerpos contra estas variantes pronto encontraron un anticuerpo en un paciente politransfundido que reaccionaba con el suero de algunos individuos pero no con otros. Esto se explicó como una simple herencia autosómica dominante consecuencia de un polimorfismo genético de las lipoproteínas de baja densidad del suero. Esta hipótesis fue sustentada y trajo como consecuencia hallazgos valiosos. Los colegas siguieron buscando anticuerpos adicionales en pacientes transfundidos y en 1963 los doctores Harvey Alter, Sam Visnich y Blumberg encontraron un anticuerpo en un paciente hemofílico transfundido que era diferente a un polimorfismo de lipoproteína de baja densidad. Como inicialmente reaccionó con un antígeno que se encontraba en el

suero de un Australiano lo nombraron *antígeno Australia (Au)*” Observaron que el antígeno era raro en la población normal de Estados Unidos pero común en pacientes con leucemia y también en poblaciones de Asia y África, así que presumieron que podía ser común en pacientes con riesgo de desarrollar leucemia. Siguiendo estos pacientes a través del tiempo se encontró que uno de ellos inicialmente negativo desarrolló después el Au de forma coincidente con la aparición de una hepatitis. Esta observación genera la hipótesis de que puede estar relacionado con la hepatitis clínica y estudios posteriores mostraron que era parte de un virus de hepatitis. Su posterior aislamiento, microscopía electrónica, transmisión y otros estudios eran consistentes con la hipótesis. El virus completo fue luego identificado por microscopía electrónica por Dane y colaboradores. Ya desde 1908 Mc Donald propuso que un virus podría estar implicado en la causa de la enfermedad hepática. Mc Cullum en 1947 propuso la existencia de dos diferentes virus: el de la Hepatitis A, transmitido por vía fecal-oral y el de la hepatitis B por sangre (Blumberg B 2002).

La inmunología y otras características de estos virus fueron investigadas por Krugman, Sherlock, Prince y otros. Parecía que el virus asociado con el antígeno australiano era el más similar al previamente presumido como el virus de hepatitis B y desde 1970 se le conoce con ese nombre. Además del virus completo, la sangre de los portadores del virus de Hepatitis B (HBV) contiene cantidades de partículas ‘hechas’ del antígeno de superficie del VHB. Irving Millan y Blumberg reconocieron que una vacuna podría ser producida mediante la extracción de estas partículas. Se hicieron los estudios experimentales apropiados, se obtuvo la patente y en 1975 una compañía farmacéutica (Merck) se licenció para desarrollar y producir la vacuna. A inicios de los ochentas fue

aprobada por la FDA. Posteriormente la vacuna se confecciono por un método recombinante. Hoy día hay programas de vacunación en más de 100 países y la vacuna para VHB esta entre las mas utilizadas en el mundo. Los resultados de su uso han sido impresionantes. Estudios han mostrado una dramática caída en la incidencia de portadores en los grupos cubiertos por la vacuna. Por ejemplo en Taiwán la prevalencia de portadores en el grupo de 12 años de edad cayo de un 10.7% en 1984 (antes del programa) a 1.5% en 1989 (después del programa). En Japón la prevalencia cayo de 3% a aproximadamente 0.3%.

El descubrimiento del virus y los métodos para su detección que resultaron de las investigaciones realizadas por Blumberg y sus colaboradores permitieron la evaluación de la sangre donada para la detección de portadores ocultos del VHB. A finales de los setentas se desarrollaron pruebas sensibles y a partir de ello la sangre de los donantes ha sido evaluada rutinariamente en la mayoría de los países industrializados (Blumberg B 2002). Además ya desde 1976 comenzaban las publicaciones acerca de la detección de los anticuerpos contra el antígeno core del VHB en diferentes grupos de población: bajo (donantes voluntarios de sangre), intermedio (pacientes de clínica por otras enfermedades), alto (contacto familiar de portadores crónicos del antígeno) y muy alto (Homosexuales masculinos) riesgo de exposición al VHB (Szmuness W 1976).

## **A 2 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VHB**

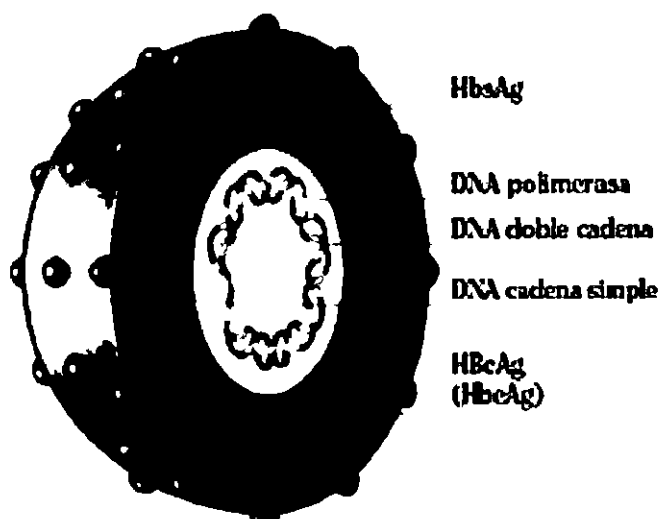
### **A 2 1 La Familia hepadnaviridae**

EL VHB pertenece a la familia hepadnaviridae. Los hepadnavirus infectan preferentemente hepatocitos aunque se han detectado pequeñas cantidades de ADN viral en riñon pancreas y en células mononucleares (Dejean et al 1984 Hoar et al 1985). Los virus animales similares al VHB humano han sido aislados a partir de roedores y aves: el virus de la marmota (WHV) (Summers et al 1978) de la ardilla (GSHV) (Marion et al 1980) del pato pequinés (DHBV) (Mason et al 1980) y el de la garza real (HHBV) (Sprengel et al 1988). Todos estos virus tienen un tropismo dirigido hacia las células hepáticas y un hospedero específico. Respecto a este tropismo hepático directo hay dos hipótesis propuestas a esta restricción: 1. El o los receptores para los virus únicamente están presentes en la superficie de los hepatocitos de especies sensibles y 2. Existe un bloqueo del ciclo viral en los tejidos no hepatocíticos. El espectro del hospedero estricto de los hepadnavirus está a favor de la primera hipótesis. Sin embargo como ya se mencionó se ha demostrado que el VHB puede fijarse y entrar en células no hepáticas (Neurath et al 1990 Peeples et al 1987). Esto sugiere que el bloqueo podría estar situado en una etapa intracelular y estaría unido a la especificidad hepática de los promotores virales (Oquendo J et al). Los virus de esta familia comparten una estructura del virión común y una organización genómica similar y todos pueden provocar hepatitis aguda y crónica de acuerdo a sus hospederos naturales (Summers 1981). La infección por el WHV y el GSHV está directamente asociada al desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC) en la marmota y la ardilla (Marion et al 1986). Las similitudes

biológicas y patológicas de los hepadnavirus permiten utilizar los animales infectados como modelos para estudiar las enfermedades provocadas por el VHB en el hombre

### A.2.2 Estructura y Genoma del VHB

El genoma del VHB tiene una organización muy peculiar está constituido por un ADN circular de doble cadena incompleta, de aproximadamente 3,200 nucleótidos (3.2 kb) que codifica para diferentes proteínas de cada uno de sus cuatro marcos de lectura abiertos (ORF *open reading frame*) En general el ADN está encerrado en una nucleocápside, formada por el polipéptido antígeno core polimerizado codificado en el ORF C la nucleocápside está rodeada por una envoltura esférica formada por el antígeno de superficie (HBsAg) codificado en el ORF S Al virión completo se le conoce como *Partícula de Dane* Ver Figura 1



**Figura 1** Estructura del VHB

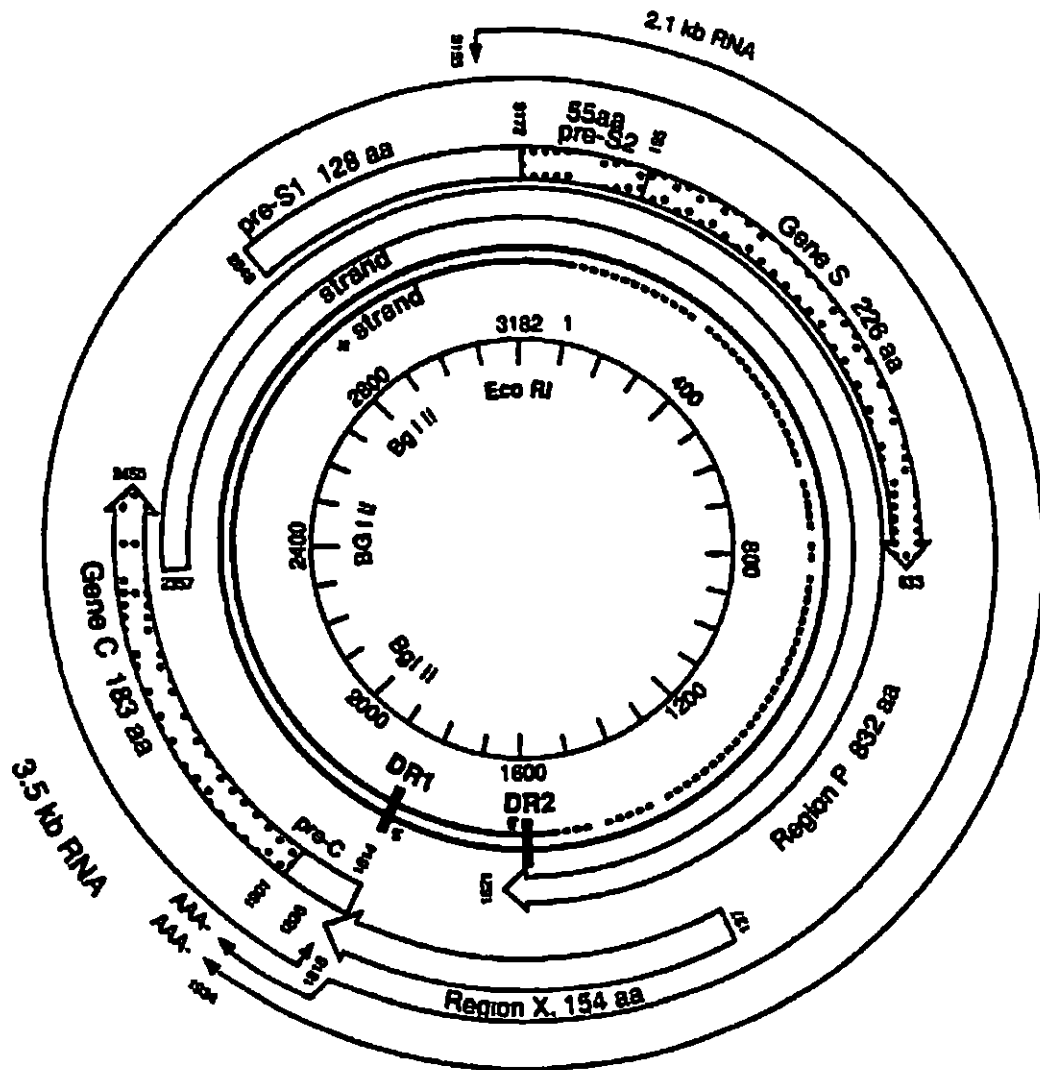
**Fig 1** El virión completo también llamado partícula de Dane, tiene un diámetro aproximado de 42 nm. Se compone de una envoltura o cubierta formada por proteínas sintetizadas por el genoma viral (antígenos de superficie) y moléculas lipídicas derivadas del huésped, y una partícula central o "core" compuesta por las proteínas de la nucleocápside, el genoma viral y un complejo polimerasa. ([http / imagesgoogle.com](http://images.google.com))

Adicional a las proteínas core y de superficie el genoma del VHB codifica una ADN polimerasa que también actúa como transcriptasa reversa, involucrada en la replicación viral codificada en el ORF P. El ORF X codifica el antígeno X del VHB el cual es una proteína trans-activadora que estimula la expresión de genes y la replicación. La cadena larga del ADN denominada L (–) tiene un tamaño de aproximadamente 3.2 kb con los extremos 5' y 3' fijos formando un círculo casi continuo.

La cadena corta, o S (+) tiene una longitud variable (1700-2800 nucleótidos) pudiendo ser hasta un 50% más corta que la L (–) con un extremo 5' fijo y un extremo 3' libre y variable. La tasa guanina + citosina es de 48%. La estructura circular del genoma está asegurada por las regiones de cohesión (220 nucleótidos) situados en los extremos 5' de cada cadena. En esta región existe una secuencia de 11 nucleótidos que se repite directamente en el otro extremo de la región de cohesión. Estas secuencias repetidas denominadas DR1 para la situada en la cadena L (–) y DR2 para S (+) se encuentran implicadas en la replicación e integración del genoma del virus en los hepatocitos. Ver Figura 2.

La organización del genoma de los hepadnavirus es bien compacta. Los cuatro marcos de lectura en la cadena (–) cubren la totalidad del genoma. Más del 50% del genoma es leído en dos fases diferentes. No existen evidencias de la presencia de proteínas codificadas por la cadena (+).





**Fig.2 Diagrama del genoma del VHB** como existe en las partículas virales la cadena larga presenta una abertura en un sitio único ( cerca de DR1) mientras que la cadena corta tiene un extremo único 5' (en DR2) y un extremo variable colocado 3' el cual es completado por la actividad endógena de la polimerasa de ADN. La cadena larga tiene 4 marcos traslapados de lectura, que codifican polipéptidos como el HBsAg (gen S) HBcAg y HBeAg (gen C) HBxAg (región X) y la polimerasa del virus (región P). Los 2.1 KB de RNA codifican polipéptidos importantes de HBsAg mientras que los 3.5 KB terminal redundante de RNA codifican el RNA pregenómico y las otras proteínas virales. La mayor parte de la integración ocurre en DR1 con el templado integrado conteniendo la mayoría o todas las secuencias de la región X, y en muchos casos también las secuencias de los genes S y preS/S (Feitelson M. Journal of Cellular Physiology 1999)

### A 2 3 Transcripción y Producción de Antígenos Proteicos

Tres genes S core (C) y pol (P) codifican proteínas que son componentes esenciales para el ensamblaje viral y la replicación mientras que el gen o región X parece jugar un papel importante en la modulación de la respuesta del huésped ante la infección. La transcripción del genoma del VHB resulta en 4 RNAs de distinto tamaño (3.5, 2.4, 2.1 y 0.7 kb) que se superponen (overlapping) de forma extensiva e importante entre los distintos ORF incrementando su capacidad codificante. Estos originan las siguientes proteínas: 1) del RNA de 3.5 kb derivan la polimerasa, el core y el pre-core; este mismo RNA sirve de molde para la transcripción inversa que originará una cadena de ADN de polaridad negativa; 2) del RNA de 2.4 y 2.1 kb derivan las proteínas de envoltura; y 3) del RNA de 0.7 kb deriva la proteína X.

Una característica importante de algunos de estos genes es que contienen diversos codones de iniciación de la traducción que dan lugar a proteínas funcionalmente diferentes. A continuación se ampliarán las características de las regiones que conforman el genoma viral y sus respectivos genes.

#### A 2 3 1 Región de los genes Pre-S1, Pre-S2 y S

El gen S codifica para la proteína pequeña de superficie SHBs del HBsAg de unos 25 KDa que representa el componente mayoritario en las envolturas vacías del virus. El gen Pre-S2 codifica la proteína mediana MHBs del HBsAg (Gp 33 / 36) la cual juega un papel importante en la unión del virus al receptor hepático siendo un buen marcador de la replicación del virus y por tanto del diagnóstico y pronóstico de la infección. Es una

proteína muy inmunogena, creando una respuesta de anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir la unión del virus al hepatocito

El gen Pre – S1 codifica la proteína mayor LHBs del HBsAg (p 39 / Gp 42) Todos estos genes (S,Pre-S2 Pre-S1) se encuentran en la misma región o marco de lectura y dependiendo del lugar de inicio de la traducción se producirán éstas proteínas de distinto peso molecular Este marco de lectura se sobrepone con la región P que a su vez se sobrepone parcialmente con la region X y al gen C Pre C

#### A 2 3 2 Region del C, Pre C

Responsable de la formación del antígeno C (HBc Ag) de la nucleocapside virica o core cuyo tamaño molecular es de 22 kDa, este antígeno proteico queda unido al reticulo endoplasmático del hepatocito sin ser secretado a la sangre La trascripcion de las regiones de los genes Pre C y C codifica la síntesis del HBeAg de 15 kDa, originandose en un primer paso un péptido precursor de unos 25 kDa, que por la accion de proteasas celulares se escinde para dar la proteína HBeAg que penetra en el reticulo endoplasmático celular y es secretado a la sangre Este HBeAg es sintetizado al mismo tiempo que el HBcAg Ambos antígenos son indicativos de replicacion viral

#### A 2 3 3 Region del gen P

Codifica la polimerasa de ADN del virus enzima básica de 92 kDa, situada en el interior de la nucleocápside con actividad de polimerasa dependiente de ARN y ADN

La ADN polimerasa del VHB presenta en sus secuencias de aminoacidos una homologia parcial con la transcriptasa inversa de varios retrovirus oncogenos y está implicada en los mecanismos de transcripción inversa del VHB y de encapsidación del ARN pre – genómico

#### A 2 3 4 Region del gen X.

Codifica una proteína x (HBxAg) de 145 aminoácidos que contiene el promotor del gen C. La función de esta proteína no es bien conocida, sin embargo se sabe que interviene en la regulación de la expresión del genoma del VHB y por tanto regula los mecanismos de transcripción y replicación del virus. El péptido x (HBxAg) es inmunógeno y se detectan anticuerpos frente al mismo en pacientes con hepatitis aguda crónica o carcinoma hepatocelular aun en ausencia de otros marcadores de infección por VHB. También se piensa que altera la expresión de genes del huésped lo que es importante para la patogénesis de la enfermedad crónica hepática (CLD) y el desarrollo de carcinoma hepatocelular asociado a VHB (HCC).

#### A.2 4 Antígenos Proteicos del VHB

##### A 2 4 1 Antígeno de superficie (HBsAg)

Se produce y se encuentra en el citoplasma del hepatocito y en sangre durante el periodo de incubación la fase aguda de la enfermedad y en el estadio crónico. En portadores altamente viremicos se ha observado que contiene una mayor cantidad de proteína mediana (Gp 33 / 36) y mayor (p 39 / Gp 42) del HBsAg que en los individuos escasamente viremicos. Los polipeptidos del HBsAg contienen uno o más receptores para la infección codificados por el virus. También tiene el determinante neutralizante "a" el cual ha sido explotado en el desarrollo de una vacuna eficaz para VHB.

Existen *subtipos de antígeno de superficie*, todos poseen el determinante antigénico "a", pero existen otros dos grupos de determinantes asociados al "a" y mutuamente excluyentes: el grupo *d/y* y el grupo *w/r* originando los 4 subtipos clásicos del HBsAg.

*adw adr ayw ayr* Se ha descrito la heterogeneidad del determinante antigenico w identificandose diez distintos subtipos del HBsAg

#### A 2 4 2 Antígeno de la capsida (HBcAg)

Este polipeptido propio de la nucleocapsida se sintetiza en el nucleo de la célula hepática y no es posible hallarlo aisladamente en el suero del enfermo sino formando parte de la *partícula de Dane* Su poder inmunogeno induce la producción de anticuerpos de las clases IgM e IgG en la infección aguda y cronica por VHB respectivamente

El HBcAg se polimeriza para formar la nucleocápsida del virus (Feitelson M 1999) La replicación del virus ocurre dentro de las partículas HBcAg (Feitelson M, 1999)

#### A 2 4 3 Antígeno e (HBeAg)

Detectable en el suero en la fase aguda de la infección por el VHB y en algunas formas cronicas con actividad de replicacion vírica Es un marcador de infectividad y replicación que debe manejarse conjuntamente con los anticuerpos anti – HBe y la deteccion del ADN viral

El HBeAg es esencial en el establecimiento de una infección persistente y en neonatos infectados por la madre durante el parto induce tolerancia al VHB por ser transplacentario

#### A.2 4 4 Antígeno x (HBxAg)

Ha sido caracterizado como una proteina trans-activadora promiscua en ensayos de gen reportero (Rossner 1992) algunos estudios han revelado que puede alterar patrones de expresión de genes uniendose a factores de transcripción en el nucleo del hepatocito y altera la actividad de muchas vias de traducción en el citoplasma Actualmente es sujeto

de estudio debido a su relacion con el desarrollo del carcinoma hepatocelular Véase C 3 2 y Fig 8

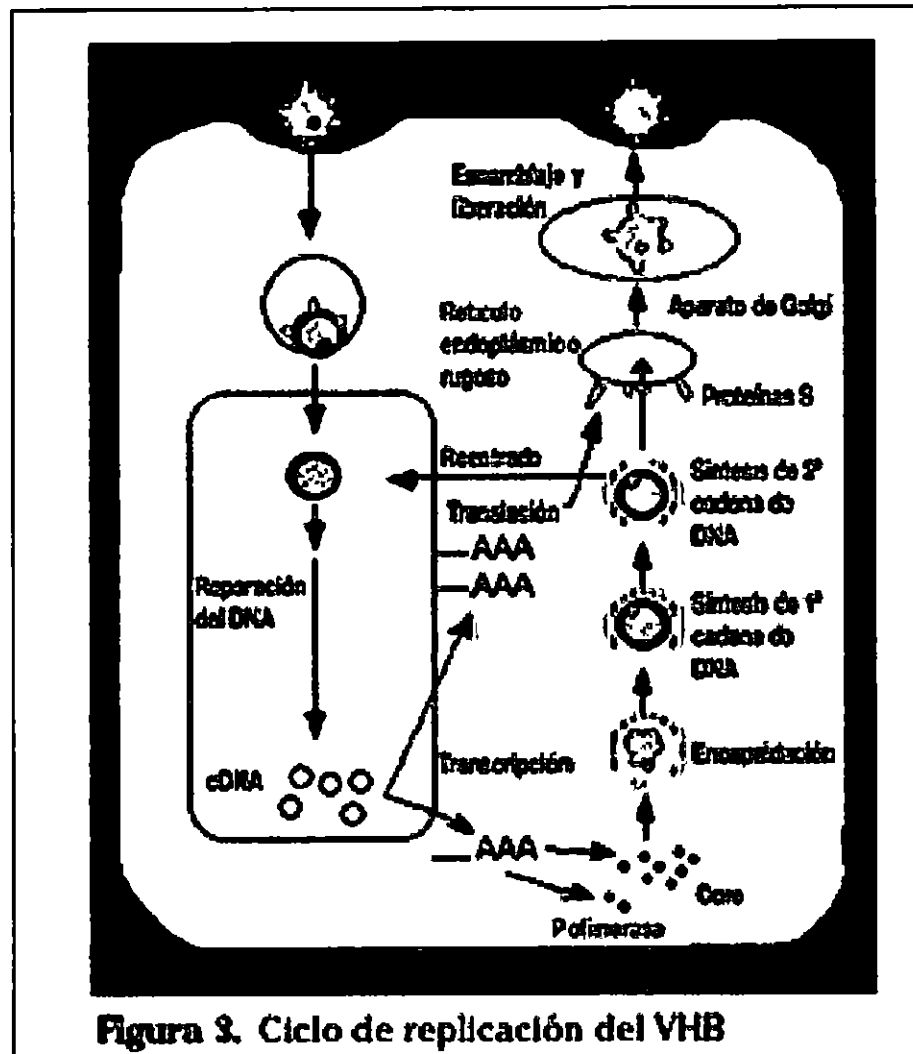
### **A.3 REPLICACIÓN DEL VHB**

#### **A.3 1 Union del VHB al Hepatocito**

Los numerosos trabajos sobre los receptores hepatociticos y el VHB han permitido identificar las proteínas que pudieran interaccionar con las particulas virales y jugar un rol en los mecanismos de penetración del virus Estas proteínas candidatas receptores son una glicoproteína de membrana de 35 KDa (Petit et al 1992) la interleuquina 6 (IL-6) (Neurath et al 1992) la apolipoproteína H (Medi et al 1994) la endoxina II (Hertogs et al 1993 Hertogs et al 1994) y una glicoproteína circulante de 50 KDa (Budkowska et al 1993) Una glicoproteína de membrana de 180 KDa ha sido igualmente identificada en el caso del virus de hepatitis del pato pequines (DHBV) (Kuroki et al 1994) Concerniente al virus mismo parece que el dominio preS1 del VHB humano en posición 21-47 (Neurath et al 1986) y el dominio preS del DHBV en posición 43 121 (Ishikawa et al 1992) están directamente implicadas en la fijación de la célula huésped

El ciclo de replicación del VHB y los virus relacionados es inusual se replican por la transcripcion reversa de un RNA intermedio La replicacion comienza con la unión del virion a la membrana del hepatocito a través de la proteína pre-S1 aunque los mecanismos de este proceso no se conocen con exactitud. A continuacion la envoltura del virion se fusiona con la membrana celular del hepatocito y la nucleocapside (core) se libera dentro del citoplasma, dirigiéndose hacia el nucleo Dentro del nucleo del hepatocito se completa la síntesis del ADN viral de tal forma que el genoma del VHB se

convierte en un ADN circular cerrado por uniones covalentes (cccADN) que sirve como base para la transcripción del RNA viral Ver Figura 3



**Fig.3 Ciclo de Replicación del VHB** En el núcleo del hepatocito el genoma viral es convertido en ADN circular cerrado covalentemente (cccADN). Este cccADN es el templado para el RNA mensajero (mRNA) el cual transcribe proteínas virales, así como también RNA pre-genómico que se transcribe reverso hacia ADN VHB de nuevos viriones. Sin la transcriptasa reversa (ADN polimerasa), los nuevos viriones no pueden producirse y se detiene la replicación. El gen core también produce un péptido circulante, el "antígeno e" que se asocia a altas tasas de replicación viral (Lin K. et al 2004).

El cccADN es muy estable parece tener una vida media muy larga y es muy resistente a la terapia antiviral lo cual explicaria la dificultad para eliminar por completo el VHB durante el tratamiento en cronicos

Posteriormente se transporta todo el RNA viral al citoplasma donde se traduce en diferentes proteinas del VHB A continuacion las proteinas de la nucleocapside se ensamblan en el citoplasma, encerrando en su interior una partícula de RNA intermediario (pre-genómico) y el complejo de la polimerasa El RNA pre genómico es la unica partícula de RNA del VHB que se encapsula. El siguiente paso es la transcripcion inversa del material genetico A partir del RNA intermediario o pre genómico se sintetiza una nueva cadena de ADN viral a la que despues se añadira otra hebra para formar un ADN bicatenario incompleto ya que la sintesis de la segunda cadena no llega hasta el final Una vez completado el proceso esta nueva partícula viral (core) puede volver a entrar en el nucleo para formar mas cccADN o por el contrario se acerca a la membrana citoplasmatica donde adquiere las proteinas de la envoltura antes de ser secretada fuera de la célula

### A.3.2 Las Partículas Virales Sericas.

En el hepatocito y suero de un individuo infectado por el VHB pueden estar presentes tres tipos principales de partículas virales por microscopia electrónica (Tiollais et al 1985)

1 La partícula de Dane o virión (Dane et al 1970) la cual se presenta como una partícula esférica de 42 nm de diámetro que cuenta con una bicapa lipídica de origen celular portadora del HBsAg

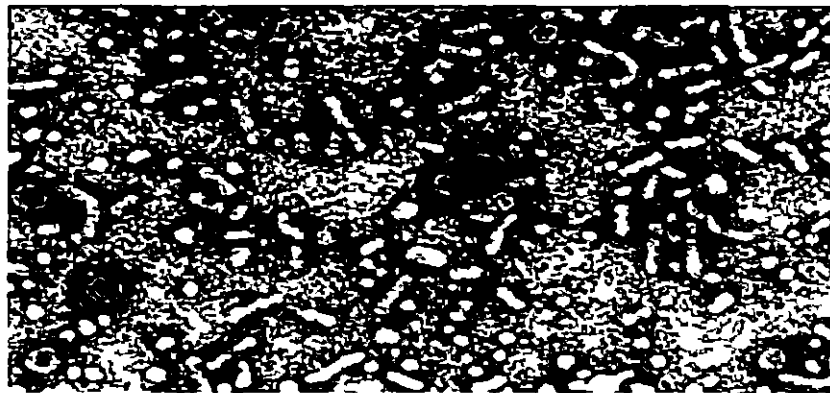


2 La proteína mayor de la nucleocápside el HBcAg no está libre en el suero pero si dentro del citoplasma y en el nucleo de los hepatocitos (Gudat y Bianchi, 1977)

3 El HBeAg, detectable en el suero (Magnius y Espmark, 1972 Takahashi et al 1980)

Existen dos tipos más de partículas en el suero estas particulas pueden ser esféricas y filamentosas de 20 nm de diámetro del mismo diámetro las filamentosas tienen longitud variable pudiendo llegar a 300 nm Véase Fig 4 Estas particulas están compuestas unicamente por proteínas de la envoltura del virus y por lípidos de origen celular

Durante la infección por el VHB las partículas virales están presentes en grandes cantidades en el suero La presencia del virión en la sangre indica que el virus esta en replicación activa y que el paciente está infectado Las partículas “vacías no infecciosas son producidas en grandes cantidades (50 300 ug del HBsAg/ml) Las razones de esta inmensa producción no son conocidas todavía Una hipótesis sugiere que las partículas vacias pudieran absorber los anticuerpos neutralizantes de los antígenos de superficie del virus y permitir así a los viriones escapar de la defensa del hospedero (Ganem, 1991)



**Fig 4 Microfotografía Electrónica de las partículas virales**  
Obsérvese las diferentes formas y tamaños [http://images/google.com](http://images.google.com)

#### **A.4 VARIANTES DEL VHB.**

El VHB presenta una tasa de variabilidad genómica relativamente alta (10% de su secuencia nucleotídica). La tasa de mutaciones de los genomas de VHB está estimada de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  sustituciones de nucleótidos por sitio por año. Esto puede deberse a la falta de un mecanismo de corrección (proofreading) de la polimerasa viral durante la transcripción reversa. La falta de corrección de errores durante la replicación así como la presión selectiva por la variación causada por el mecanismo de vigilancia del sistema inmune del huésped puede explicar el origen de algunas mutaciones. La tasa de mutaciones durante la replicación viral podría ser más alta, pero la característica compacta del genoma restringe la ocurrencia natural de mutaciones. Como los ORF están sobrepuestos si ocurre una mutación dentro de un ORF que produzca un virus más patógeno se pueden generar mutaciones concurrentes en el ORF sobrepuesto pero se disminuye la probabilidad de producir una **variante viable**. Los anticuerpos anti HBs después de su inducción por la vacunación reconocen el determinante altamente antigénico y neutralizan el HBsAg. Sin embargo después de la vacunación se ha reportado la co-existencia de HBsAg y anti HBs que es una evidencia de **mutantes de VHB**.

Estas mutantes pueden replicarse de forma independiente y se encuentran al azar en algunas poblaciones asintomáticas. El primer caso con presencia de HBsAg y anti HBs fue reportado en Italia en el suero de un paciente previamente inyectado con HBIG (inmunoglobulina de VHB) y la vacuna de VHB. Se observó que el HBsAg de la vacuna contenía una mutación Gly<sub>145</sub> por Arg<sub>145</sub> (sustitución del aminoácido glicina por arginina en la posición 145). Posterior a este hallazgo se han reportado transmisiones

verticales y horizontales de mutantes de HBsAg y algunas de ellas se han encontrado responsables de daños severos al hígado (Chen N et al 2002) Se han descrito mutaciones en todas las regiones del genoma del VHB que afectan tanto a la evolución clínica de la infección por VHB como a su respuesta terapéutica, sino que tienen consecuencias importantes desde el punto de vista diagnóstico (patrones serológicos atípicos) preventivo (reformulación de la vacuna) y epidemiológico (transmisión vertical / horizontal de las variantes) En forma general podríamos describir las variantes del VHB de la siguiente manera

#### A.4.1 Variantes defectuosas Pre – C

Carman et al (1989) comunicaron el hallazgo de cepas de VHB que presentaban una mutación puntual (codón 1896) en la región Pre-C del genoma que impide la transcripción de las secuencias Pre- C y C y la síntesis de antígeno HBe Estudios posteriores demuestran que la mutación Pre- C no es selectiva en cuanto al lugar pueden presentarse mutaciones en distintos codones de la secuencia Pre C con las mismas consecuencias Además estas variantes se generan por selección inmunológica en el individuo infectado Este tipo de variantes se detecta con frecuencia en los pacientes con hepatitis B crónica activa resistente al tratamiento con interferón con anticuerpos anti HBe y bajos niveles de ADN vírico circulante También se asocia a carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante

#### A.4.2 Variantes defectuosas a (de envoltura o escape).

Son cepas del VHB incapaces de expresar el determinante antigénico común “a” del HBsAg escapando a la respuesta inmune inducida por la vacuna del VHB Presentan una

mutacion en el gen S que se traduce en cambios en los aminoácidos de la proteína de superficie (HBsAg) que a su vez origina una alteración de los epitopos inmunodominantes del determinante a que impide su reconocimiento con anticuerpos monoclonales específicos. Se han descrito variantes de escape por mutaciones en los codones 126, 129, 133, 141 y 145 del gen del HBsAg con fracaso de la inmunoprofilaxis en recién nacidos de madres portadoras de HBsAg.

Es posible no diagnosticar la infección por variantes de escape del VHB cuando se utilizan métodos de diagnóstico serológico basados exclusivamente en anticuerpos monoclonales frente al determinante a del HBsAg. Además la posibilidad de transmisión parenteral / sexual de estas variantes defectuosas implica una reformulación de la vacuna que incluye el HBsAg recombinante mutado.

#### A 4.3 Mutaciones en el gen X

Generalmente localizadas en los codones 130 y 131 de dicho gen, y con frecuencia asociadas a mutaciones en la región promotora del core. La infección por cepas VHB con mutaciones en el gen X cursa con ausencia de marcadores serológicos de infección por VHB. Se asocia, con frecuencia a carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante. El diagnóstico requiere siempre técnicas de amplificación genómica de dicho gen (PCR).

#### A 4.4 VHB tipo 2

Se caracteriza desde el punto de vista serológico por reactividad aislada al HBsAg sin seroconversión anti HBc y ausencia de HBeAg. Transitoriamente pueden detectarse anticuerpos anti HBs con niveles bajos de HBsAg y ADN vírico. El diagnóstico de la infección por VHB tipo 2 implica incrementar la sensibilidad de los métodos de detección actual del HBsAg, mediante ensayos que introduzcan anticuerpos policlonales.

y monoclonales específicos de la región Pre S<sub>2</sub> de subtipo d o mediante técnicas de PCR del gen S. El origen del tipo 2 del VHB parece estar relacionado con la aparición de mutaciones en el gen X (regulador de la replicación) que ocasiona que el virus se replique y exprese de forma insuficiente siendo incapaz de estimular una respuesta inmune adecuada.

#### **A.4.5 Variantes del VHB con expresión anómala de los determinantes antigénicos de subtipo.**

Se originan por mutaciones en el gen S del VHB. Se han descrito dos situaciones: a) coexistencia de determinantes antigénicos mutuamente excluyentes en el suero de un mismo paciente (coinfección o reinfección por cepas VHB de distinto subtipo) y b) ausencia de expresión de los determinantes de subtipo (Alcaraz M.J.)

### **A.5 GENOTIPOS DEL VIRUS DE HEPATITIS B**

El virus de Hepatitis B está clasificado en 8 genotipos (A-H) de acuerdo a los análisis filogenéticos de su secuencia genómica. Los primeros cuatro genotipos (A-D) fueron descritos por Okamoto y colegas (1988) seis años después dos genotipos adicionales, (E,F) y uno de los más recientes G ha sido descrito en Francia y Estados Unidos (Kao J et al, 2002).

**A.5.1 Distribución geográfica** Su distribución geográfica es diferente. Los genotipos A y D se muestran prevalentes en Europa y USA, mientras que los genotipos E y F se encuentran restringidos a África y son prevalentes en Centro y Suramérica, respectivamente<sup>35</sup>. Hay cuatro diferentes recombinantes (A/D, B/C, Ba, Bj) cada uno de

estos recombinantes está asociado con una endemidad geográfica diferente (Kao J et al 2002)

Los genotipos B y C han sido reportados como comunes en el este de Asia. En Japón los genotipos B y C se reportaron en 12 % y 85% respectivamente en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas (Imamura T et al 2003)

Recientemente el genotipo B ha sido subclasificado en 2 subtipos nombrados *Bj* (subtipo encontrado exclusivamente en Japón) y *Ba* (encontrado principalmente en el resto de Asia) El subtipo *Ba* emerge como resultado de la recombinación de las regiones core y pre core del genotipo C con el "original" genotipo B el subtipo *Bj* (Yuen M. et al 2004)

En un estudio realizado por Masaharu T et al se clasificó una cepa encontrada en Mongolia dentro del genotipo F y 21 cepas restantes se agruparon dentro del genotipo D concordando con hallazgos de autores como Alesting et al en donde nueve cepas de VHB de Mongolia estudiadas fueron del genotipo D El hallazgo de cepas de genotipo D circulando en Mongolia refleja el contacto cercano económico y cultural con el Este de Europa y el área mediterránea donde prevalece este genotipo el genotipo F sigue siendo raro en países asiáticos (Takahashi M. et al 2004)

#### A.5.2 Relación del genotipo del VHB con la severidad de la enfermedad

Existen estudios realizados para observar si existe o no relación entre el genotipo del VHB y el grado de severidad de la enfermedad Principalmente existen referencias comparativas entre el genotipo B y el genotipo C prevalentes en el este de Asia

En el Sureste de Asia se sugiere que el genotipo C del VHB está asociado con una mayor prevalencia del antígeno e de la Hepatitis B hepatitis más activa (Chan H. et al 2002)

Kao J H et al 2002 Lindh M. et al Lok, A.S F et al 1987) enfermedad hepática mas avanzada (Kao J et al 2000 Lee C M et al 2002) y alta prevalencia de carcinoma hepático celular (Fujie,H. et al 2001 Lee C M et al 2002 Tsubota, A et al 2001) que en el genotipo B <sup>14</sup>

El significado de los genotipos del VHB en terminos de consecuencias clínicas y respuesta terapéutica a la terapia antiviral en pacientes con hepatitis B crónica permanecían desconocidos hasta hace poco Actualmente muchos estudios sugieren que la terapia con interferón alfa para hepatitis B crónica presenta una respuesta baja, si la enfermedad hepática está relacionada con el genotipo C Además otros estudios han mostrado que los pacientes con genotipo B tienen una mayor probabilidad de seroconversión del antígeno e que los pacientes con genotipo C (Chu C J et al 2002 Sumi H et al 2003 Yuen M F et al 2002) y en estudios previos se observó que los pacientes con genotipo B tienen una seroconversión hacia el anti HBe nueve veces más temprana que aquellos con genotipo C (Yuen, M F et al 2003) Aun no se termina de definir si este fenómeno es debido a la diferencia en virulencia de los dos genotipos que hace que la respuesta inmune durante la fase de clarificación inmunológica sea comparativamente mas efectiva en pacientes con el genotipo B

Man Jung Yuen *et al* compararon en 180 pacientes chinos con hepatitis B crónica y genotipos B (subtipo Ba) y C la probabilidad de seroconversión del HBeAg y replicación viral antes y después de la seroconversión al HBeAg Los pacientes HBcAg positivos con subtipo Ba resultaron con una tasa acumulativa de seroconversión del HBeAg mayor que en los pacientes con genotipo C ( $P=0.02$ ) Sin embargo no hubo

diferencia en los niveles de ADN de VHB en los dos grupos de pacientes en diferentes fases de la enfermedad.

Autores como Jia Horng Vao habian explorado los fenotipos clinicos en 272 pacientes taiwaneses con hepatitis B crónica infectados con los genotipos B y C con especial referencia a la seroconversión al HBeAg y a la frecuencia de exacerbación aguda entre los pacientes. La prevalencia del genotipo C en pacientes con multiples episodios de exacerbación aguda, en quienes falló la seroconversión al HBeAg, fue significativamente mayor ( $P = 0.025$ ) que en aquellos con seroconversión al HBeAg o negativos al HBeAg en el momento de la selección y sin exacerbaciones agudas. Se concluyó que los pacientes con infección por el genotipo C tienen un fenotipo clinico más agresivo que aquellos con genotipo B lo cual contribuye a formar grupos progresores de la enfermedad hepática y de pobre desenlace clinico. En un estudio recientemente realizado en Panamá sobre el genotipo presente entre la comunidad china residente en el país, se encontraron como predominantes los genotipos B y D (Ortiz A. Martinez A, 2007).

## **B MODOS DE TRANSMISIÓN DEL VHB**

El VHB es transmitido a través de sangre y otros fluidos corporales, incluyendo semen y saliva es 100 veces más infeccioso que el VIH, y a diferencia de éste puede vivir fuera del cuerpo en sangre seca por más de una semana. La forma de transmisión puede variar dependiendo del área geográfica. En el Sureste de Asia, China y África Sub-Sahara la infección por VHB es usualmente adquirida perinatalmente o en la infancia temprana, llevando a una más alta prevalencia de infección crónica (5-20%). Durante el embarazo y en ausencia de profilaxis, el riesgo de transmisión perinatal es de 10% si la madre es positiva por HBsAg, pero de un 90% si la madre tiene HBeAg. En países desarrollados



el virus es transmitido sexualmente o a través del uso de drogas intravenosas. En trabajadores de la salud la exposición ocupacional es causa importante de infección.

#### **B 1 Grupos con mayor riesgo de infección por VHB**

- Personas con una historia de ETS
- Trabajadores de la salud
- Pacientes de hemodialisis
- Usuarios de drogas intravenosas
- Niños nacidos de madres infectadas con hepatitis B
- Inmigrantes y niños de inmigrantes de áreas hiperendémicas
- HSH
- Personas con más de un compañero sexual en un periodo de 6 meses
- Compañeros sexuales de personas infectadas con VHB
- Pacientes que requieren transfusión sanguínea

#### **B 2 Transmisión de VHB por Transfusión Sanguínea**

La incidencia de la infección por VHB postransfusional ha sido reducida significativamente con el desarrollo de pruebas serológicas para la detección de HBsAg y anti HBc. Sin embargo, es bien conocido que algunos derivados sanguíneos negativos por HBsAg pero positivos por anti HBc son capaces de transmitir la infección después de la transfusión o el transplante de órganos. La presencia de anti HBc sin ningún otro marcador serológico de VHB se encuentra frecuentemente en diferentes grupos poblacionales (Gutierrez C et al 2001).

Diferentes situaciones pueden influir en este resultado.

- 1 Falso positivo de anti HBc
- 2 Pacientes o donantes con bajos niveles de replicación del virus dentro del hepatocito sin producción detectable de HBsAg
- 3 Pacientes en el periodo de ventana de la fase aguda de la infección por VHB
- 4 Pacientes con perdida con de anti HBs a traves del tiempo o falla en el desarrollo de anticuerpos contra el antígeno después de la infección
- 5 Presencia de una mutante de escape la cual no es detectada por la mayoría de las pruebas disponibles en el mercado para HBsAg (Gutiérrez C et al 2001)

#### **B 2 1 Seroprevalencia de VHB en donantes de los Bancos de Sangre de la Republica de Panama**

Panama cuenta en la actualidad con 26 Bancos de Sangre que colectan sangre 19 de atención pública y 7 de atención privada (datos al 2007) ver Tabla 1 y Gráfico 1 En Panamá comenzó la implementación mandatoria de la determinación del anti HBc para las unidades de sangre a partir del año 2000 y a través de estos años se ha observado el número creciente de unidades positivas por anti HBc lo que ha disminuido el número de unidades viables para transfusión La eliminación de estas unidades representa un costo elevado para las instalaciones públicas que es en donde se da el mayor número de donaciones En la siguiente tabla se resume el número total de unidades donadas por año desde el 2003 al 2006 y el costo que representa el número de unidades anti HBc positivas tomando como precio para la unidad \$58 00 que es el costo que se estableció según un estudio realizado en el Banco de Sangre del CHMAAM.

Tabla No 1

**PREVALENCIA DE ANTI-HBc EN LOS BANCOS DE SANGRE ESTATALES Y PRIVADOS DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS Y BANCOS DE SANGRE SEGUN  
NUMERO DE UNIDADES RECIBIDAS/POSITIVAS Y PORCENTAJE DE SEROPREVALENCIA DE ANTI-HBc EN LA REPUBLICA DE PANAMA, AÑOS 2003-2008**

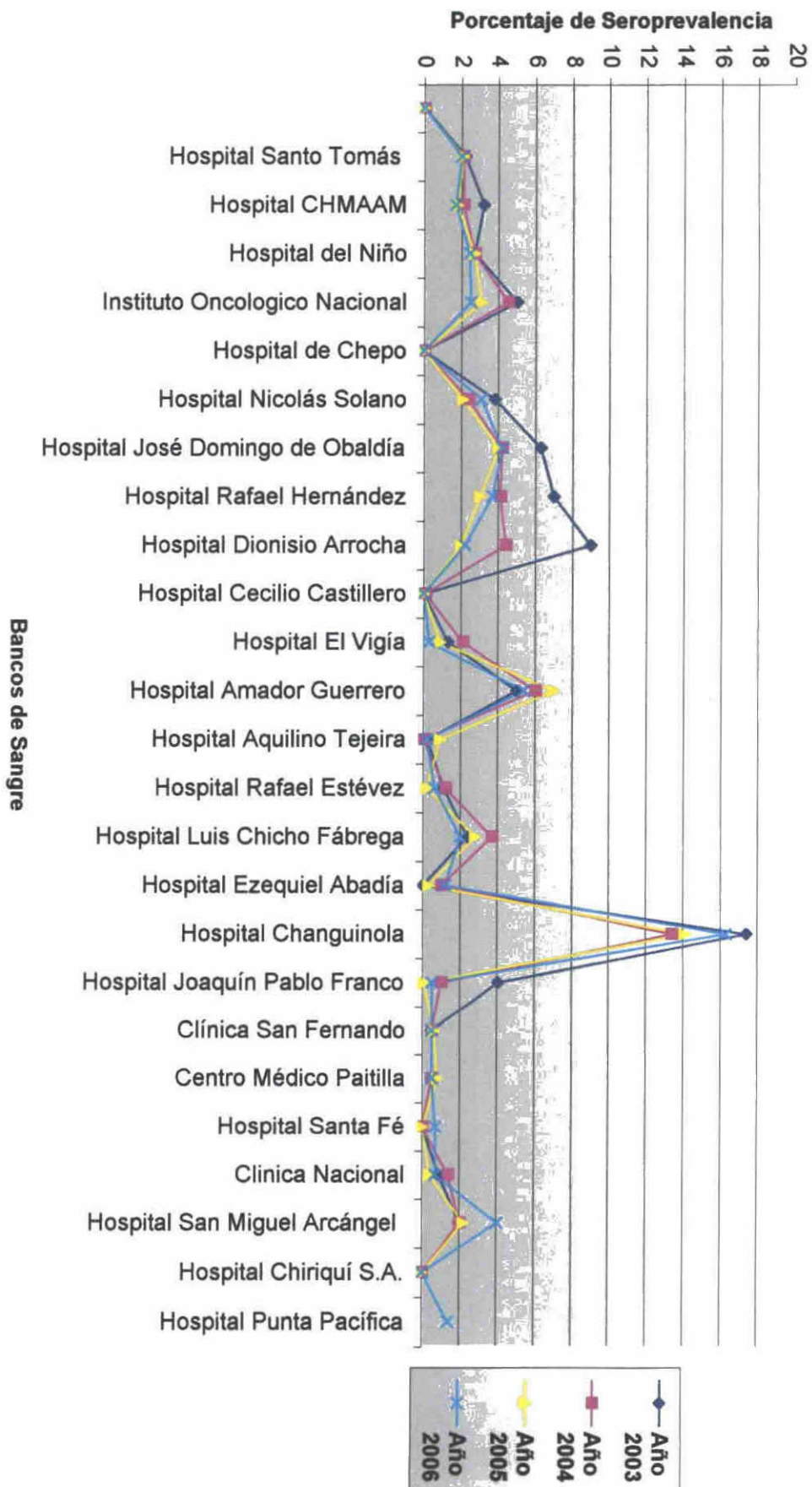
HOSPITALES/BANCO DE SANGRE	Año 2003		Año 2004		Año 2006		Año 2008	
	# Unidades Recibidas ( )	% Seroprevalen- cia de Anti- HBcore	# Unidades Recibidas ( )	% Seroprevalen- cia de Anti- HBcore	# Unidades Recibidas ( + )	% Seroprevalen- cia de Anti- HBcore	# Unidades Recibidas ( )	% Seroprevalen- cia de Anti- HBcore
1 Hospital Santo Tomás	6772/(155)	2.2	7 685/156	2.1	6993/149	2.1	7634/154	2
2 Hospital CHIMAM	11 793/(378)	3.2	9 718/204	2.1	10204/182	1.78	11175/191	1.7
3 Hospital de Especialidades Pediátricas								
4 Hospital del Niño	2 856/(78)	2.7	2524/67	2.7	2425/67	2.7	2414/59	2.44
5 Instituto Oncológico Nacional	2 389/(116)	4.9	2178/98	4.5	2292/71	3.1	2522/84	2.5
6 Hospital de Chepo	****	****	288--	****	272--	****	274--	****
7 Hospital Nicolás Solano	1 362/(52)	3.8	1474/35	2.4	1271/27	2.1	1368/42	3.1
8 Hospital Susana Jones Caro								
9 Hospital José Domingo de Obaldía	1 870/(116)	6.3	2086/87	4.2	2113/85	4.02	2028/85	4.2
10 Hospital Rafael Hernández	3381/(233)	6.9	3306/137	4.1	3117/95	3.04	3059/113	3.7
11 Hospital Dionisio Atrocha	761/(67)	8.8	879/30	4.4	490/9	2	450/10	2.2
12 Hospital Cecilio Castillero			1432/1	0.1	1344--	****	1252--	****
13 Hospital El Vigía	457/(9)	1.3	739/16	2.1	739/7	0.9	759/2	0.3
14 Hospital Anita Moreno								
15 Hospital Amador Guerrero	2 139/(105)	4.9	2099/119	6	1939/132	7	1839/105	5.4
16 Hospital Aquilino Tejera	648/(1)	0.2	631--	****	514/5	0.8	547/1	0.2
17 Hospital Rafael Estévez	1 136/(13)	1.1	1290/15	1.2	1243/3	0.2	1163/7	0.6
18 Hospital Luis Chicho Fábrega	1284/(31)	2.4	1478/55	3.7	1339/38	2.8	1285/26	2
19 Hospital Ezequiel Abadía	444 ( )		398/4	1	364/1	0.3	420/5	1.2
20 Hospital Changüinola	763/(133)	17.4	910/122	13.4	941/133	14.1	940/154	16.3
21 Hospital Joaquín Pablo Franco	812/(33)	4.08	803/8	1	802/1	0.1	941/5	0.5
DONANTES (SUB-TOTAL)								
22 Clínica San Fernando	1,867/(10)	0.5	1901/9	0.5	1023/8	0.6	1575/8	0.5
23 Centro Médico Peñilla	962/(5)	0.5	742/4	0.5	772/6	0.8	1030/5	0.5
24 Hospital Santa Fé			98/-	****	156/-	****	138/1	0.7
25 Clínica Nacional	683/(6)	0.9	640/9	1.4	681/3	0.4	834/6	0.7
26 Hospital San Miguel Arcángel	745/(15)	2	644/13	2	497/11	2.2	472/19	4.02
27 Hospital Chiriquí S.A.			111/-	****	128/-	****	250/-	****
28 Hospital Punta Pacifica							202/3	1.4
DONANTES (PREVALENCIA (TOTAL))								
	43 103/(2 334)	6.4	44 267/1 186	2.7	42 570/1031	2.42	45,660/1065	2.33

Fuente: Datos obtenidos de la estadística de los Bancos de Sangre de la Red Nacional de Laboratorios y Bancos de Sangre (Consolidados) | Base de datos de Hospital Santo Tomás

No colecta sangre Reciben compuestos de otros Bancos de Sangre

\*\*\*\*N indicaron la cantidad realizada

**Gráfico No.1**  
**Prevalencia del Marcador Anti-HBcore en los Bancos de Sangre de la Rep. de Panamá,**  
**años 2003-2006**



**Tabla 2 Numero de Donaciones Realizadas en todo el país y Numero de Unidades Anti-HBc positivas, por costo, % de seroprevalencia de Anti HBc según año**

<b><u>Año</u></b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>
<b>No DE DONACIONES REALIZADAS</b>	46 176	44 323	42 771	45 650
<b>No DE UNIDADES ANTI HBc POSITIVAS</b>	2 334	1 186	1 031	1 065
<b>Costo Aproxim (\$58 00 por unidad)</b>	<b>\$ 135,372</b>	<b>\$ 68 788</b>	<b>\$59,798</b>	<b>\$61,770</b>
<b>% de Seroprevalencia</b>	<b>5.4*</b>	<b>2.7</b>	<b>2.42</b>	<b>2.33</b>

*Fuente Estadísticas de la Red Nacional de Bancos de Sangre*

\*En el año 2003 hubo una mayor seroprevalencia debido al porcentaje de unidades anti HBc positivas en los Bancos del Hospital Rafael Hernández y José Domingo de Obaldía, debido a que los donantes rechazados en un hospital por su condición de anti HBc+ iban al otro hospital debido a la cercanía entre uno y otro. Estos donantes no eran diferidos por más de 3 meses y asistían varias veces al año a las dos instalaciones por tanto los dos hospitales mostraron seroprevalencias similarmente altas en el año 2003 (Ver Tabla 2). Esta situación se mejoró al iniciar una comunicación entre los dos hospitales con listados de sus donantes anti HBc + por tanto luego eran rechazados en ambos hospitales. Al año siguiente la seroprevalencia de anti HBc+ bajó a la mitad del porcentaje del año 2003.

Entre los 26 Bancos de Sangre de la República de Panamá, existen 6 de éstos que manejan un elevado número de donantes en el país, y por tanto la mayoría de las unidades anti HBc positivas. En la tabla siguiente se presentan cifras del número de

donantes atendidos en estos Bancos y el porcentaje de unidades anti HBc positivas desde el año 2003 hasta el año 2006 Entre éstos el Banco de Sangre de Changuinola, mantiene la más alta seroprevalencia de unidades anti HBc+ positivas del país (el promedio es de 15% del 2003 2006)

**Tabla 3 Número de Donantes Atendidos y % de Anti-HBc+ segun año y Banco de Sangre.**

Institución	# Donantes Atendidos 2003	# Donantes Atendidos 2004	# Donantes Atendidos 2005	# Donantes Atendidos 2006	% Anti-HBc + 2003	% Anti-HBc+ 2004	% Anti-HBc+ 2005	% Anti-HBc+ 2006
<b>B/S HST</b>	6 772	7 685	6 993	7 634	2.2	2.1	2.1	2.01
<b>B/S CHAAM</b>	11 793	9 716	10,204	11 175	3.2	2.1	1.7	1.7
<b>B/S CHMAG</b>	2 138	2 099	1 938	1 938	4.9	5.7	6.8	5.4
<b>B/S H. Rafael Hernández</b>	3,361	3,306	3 117	3 059	7.0	4.1	3.04	3.69
<b>B/S JOSE D DE OBALDÍA</b>	1 870	2 086	2 113	2 028	6.3	4.2	4.02	4.2
<b>B/S CHANGUINOLA</b>	763	910	1 009	940	17.4	13.4	14.1	16.3

*Fuente: Estadísticas de la Red Nacional de Bancos de Sangre. Resaltados en negrita están los altos porcentajes de los Bancos de Rafael Hernández José D de Obaldía en el año 2003 y Changuinola del 2003 2006*

El Banco de Sangre de Changuinola, se encuentra dentro del Hospital Regional de Changuinola, que es dependencia de la Caja de Seguro Social atiende una amplia población de la provincia de Bocas del Toro y no cuenta con una infraestructura adecuada. Ver Fotos en Anexo No 3 Cuenta con un equipo automatizado de metodología MEIA, para la determinación del anti HBc Principalmente la población que se atienden son indígenas jornaleros que trabajan en las fincas de bananos

El Banco de Sangre del CHMAAM atiende la cuarta parte de los donantes del país hace 3 años que fue remodelado y cuenta con personal 24 horas y la infraestructura para atender adecuadamente a esta población. El equipo con que cuentan para determinación de anti HBc es de metodología MEIA. Las donaciones realizadas son para pacientes asegurados.

El Banco de Sangre del Hospital Regional Rafael Hernández atiende la población asegurada de la Provincia de Chiriquí. No cuenta con buena infraestructura para la atención del donante, aunque mejor que la del Hospital de Changuinola. Cuenta con varios equipos automatizados para realizar pruebas para los donantes. Ver Fotos en Anexo No 2.

El Banco de Sangre del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía atiende tanto a población asegurada como no asegurada ya que funciona como Patronato de la Caja de Seguro Social y MINSA, cuenta con nueva infraestructura y con equipo automatizado para la realización de las pruebas. Ver Fotos en Anexo No 1.

El Banco de Sangre del Complejo Hospitalario Manuel Amador Guerrero es dependencia de la Caja de Seguro Social. Sin embargo, por ser el único hospital estatal de la Provincia de Colón, funciona como hospital integrado de manera que atienden tanto población asegurada como no asegurada. La seroprevalencia promedio en Colón de anti HBc es de 5.7% (años 2003-2006).

## **B 2 2 Manejo de los Donantes positivos por HBsAg y anti HBc en los Bancos de Sangre del país**

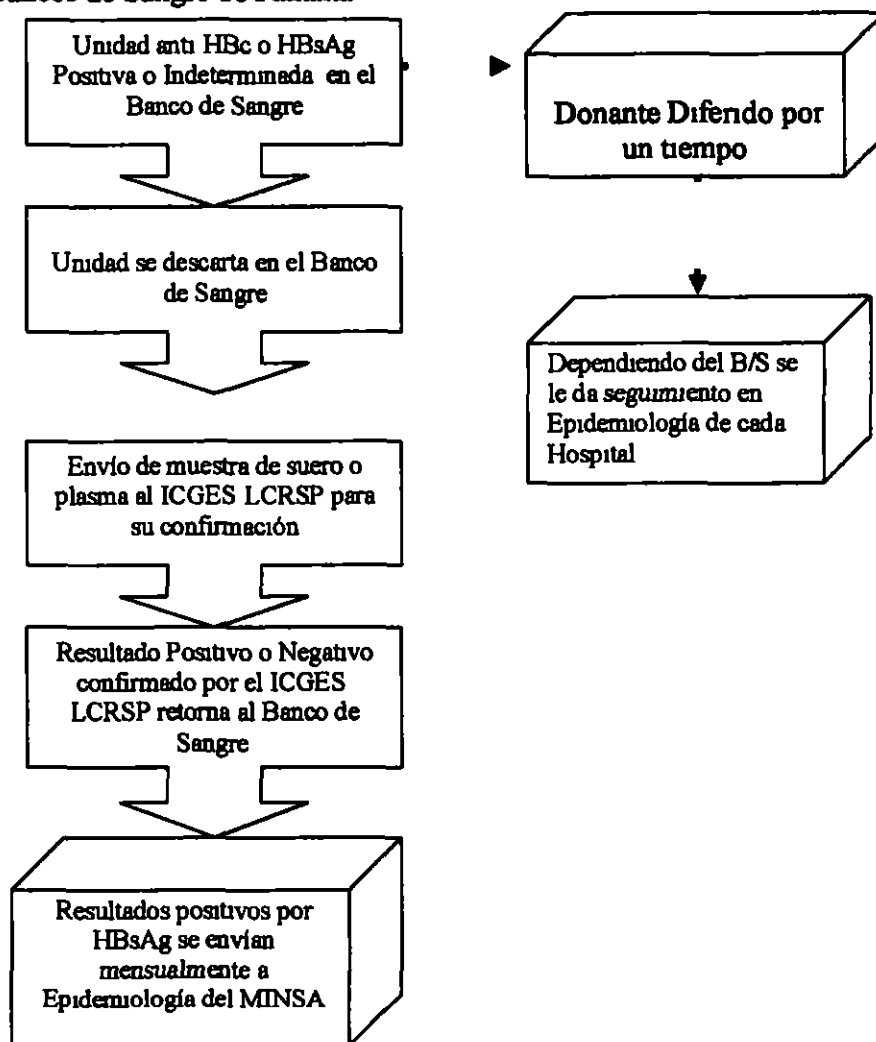
Como en Panamá, hasta ahora no existe un algoritmo establecido o normalizado para el manejo de los donantes que resultan positivos por HBsAg y anti HBc cada Banco de Sangre ha definido su manejo particular en cuanto a los marcadores serológicos que realizan para acompañar estos resultados y en cuanto al seguimiento que se le da al donante incluso no hay un tiempo establecido por ley o norma por el que se debe diferir estos donantes hasta una próxima donación

Hasta ahora lo que sí está establecido es que estas unidades se descartan y que muestras de suero o plasma de estas unidades anti HBc y HBsAg deben ser enviadas al ICGES LCRSP para su confirmación. Los resultados de la confirmación se devuelven a los respectivos Bancos de Sangre y de parte de la Sección de Inmunoserología del ICGES LCRSP sólo se informan mensualmente los HBsAg positivos a Epidemiología del MINSA

A continuación se resumirá mediante flujograma en la figura 5 el manejo actual de estas unidades



**Figura 5** Diagrama que representa el manejo de las muestras de unidades anti HBc y HBsAg positivas en los Bancos de Sangre de Panamá



### **C PATOGÉNESIS Y COMPLICACIONES.**

La hepatitis B es una causa significativa de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo más de 300 millones de personas tienen hepatitis B crónica. En Estados Unidos la infección por hepatitis B crónica es responsable de cerca de 5 000 muertes anuales por cirrosis y carcinoma hepatocelular. La infección por el VHB es altamente variable y puede presentarse como una infección subclínica hasta una hepatitis fulminante.

### **C 1 Infección Aguda.**

La infección aguda es subclínica en 70% de los adultos y 90% de los niños menores de 5 años desarrollan anticuerpos contra el virus como unico el indicativo de exposición La incubación después de la infección perdura de 1-4 meses Otro 25% de los agudamente infectados desarrollan hepatitis aguda, que puede o no ser clínicamente aparente

Los síntomas de la infección aguda incluyen nausea, anorexia, fatiga, bajo grado de fiebre dolor en el cuadrante superior derecho o epigastrio La ictericia clínica aparece al deteriorarse la capacidad del hígado para eliminar los desechos metabólicos la bilirrubina se acumula en la sangre (Guía de Hepatitis Abbott) Las manifestaciones extrahepáticas de la infección aguda incluyen mialgias, dolor en las articulaciones y urticaria. Los síntomas de la enfermedad aguda se resuelven de uno a tres meses sin embargo algunas personas presentan fatiga prolongada. Los hallazgos de laboratorio muestran niveles de transaminasas hepáticas (ALT y AST) que reflejan daño hepatocelular y alcanzan niveles de muchos cientos hasta 20 000 UI/l. Estos valores tienden a aumentar de una a dos semanas antes de la aparición de la ictericia. Los valores de bilirrubina sérica son usualmente menores de 20mg/dl (342 umol/l) Hay una anemia leve así como linfocitosis relativa. Una forma más severa resulta en la prolongación del tiempo de protrombina (TP) y una disminución en el nivel de albumina sérica.

Como marcador serológico importante está el HBsAg después de 4 semanas seguido de la aparición de anti HBc sobre todo el anti HBc de tipo IgM.

El VHB no es citopático y el daño al hígado es causado por la respuesta inmune del huésped contra los hepatocitos infectados La infección aguda lleva a falla hepática fulminante y necrosis hepatocelular masiva en cerca del 1% de las infecciones Algunos

pacientes con respuesta inmune exuberante progresan hacia una descompensación hepática, incluyendo encefalopatía y coagulopatía. La mortalidad es alta y casi siempre se requiere trasplante hepático

## **C 2 Infección crónica**

La infección crónica por el VHB supone un problema de salud pública importante. Alrededor del 10% de los adultos infectados crónicamente por el VHB presentan HBsAg y HBeAg; de éstos 20% desarrollan hepatitis crónica activa con riesgo elevado de aparición de cirrosis, carcinoma hepatocelular o ambos.

En un 5-10% de éstos pacientes crónicos se produce seroconversión espontánea hacia anti HBe, mientras que con tratamiento con interferón la seroconversión se eleva al 30-40%. En los portadores con anti HBe 3-9% desarrolla hepatitis crónica activa y 1-5% cirrosis. La desaparición del HBsAg del suero de individuos con infección crónica por VHB es un hecho infrecuente. Su incidencia anual es de un 0.4-2% en los países desarrollados y de 0.1%-0.7% en áreas endémicas donde la transmisión es sobre todo perinatal. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos pacientes pueden desarrollar hepatitis B fulminante, cirrosis y carcinoma hepatocelular por la aparición de mutaciones en el gen X del VHB.

La persistencia de HBsAg y ADN VHB por más de seis meses se considera una infección crónica. Este estado conlleva el más alto grado de riesgo de progresión a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Clínicamente la infección crónica por VHB también ha sido asociada con poliarteritis nodosa, vasculitis sistémica, y glomerulonefritis membranoproliferativa o membranosa; estas condiciones se relacionan con la formación de complejos inmunes.

La mayoría de los adultos crónicamente infectados son asintomáticos y no llegan a desarrollar enfermedad hepática significativa, sin embargo de 10 a 30% desarrollan hepatitis crónica, la cual progresa a cirrosis y finalmente a carcinoma Ver Fig 7

En la infección crónica temprana los hepatocitos en el hígado están quiescentes y se mantiene la arquitectura normal del hígado Después de años con CLD muchos hepatocitos son regenerados dentro de una arquitectura hepática anormal característica de nódulos cirróticos Este proceso se acompaña de un incremento en la cantidad de ADN viral integrado

Podemos resumir las fases de la infección por VHB basados en las ideas actuales que apoyan el concepto de cuatro distintos estados de la infección por VHB que pueden ser usados para describir la enfermedad aguda y crónica

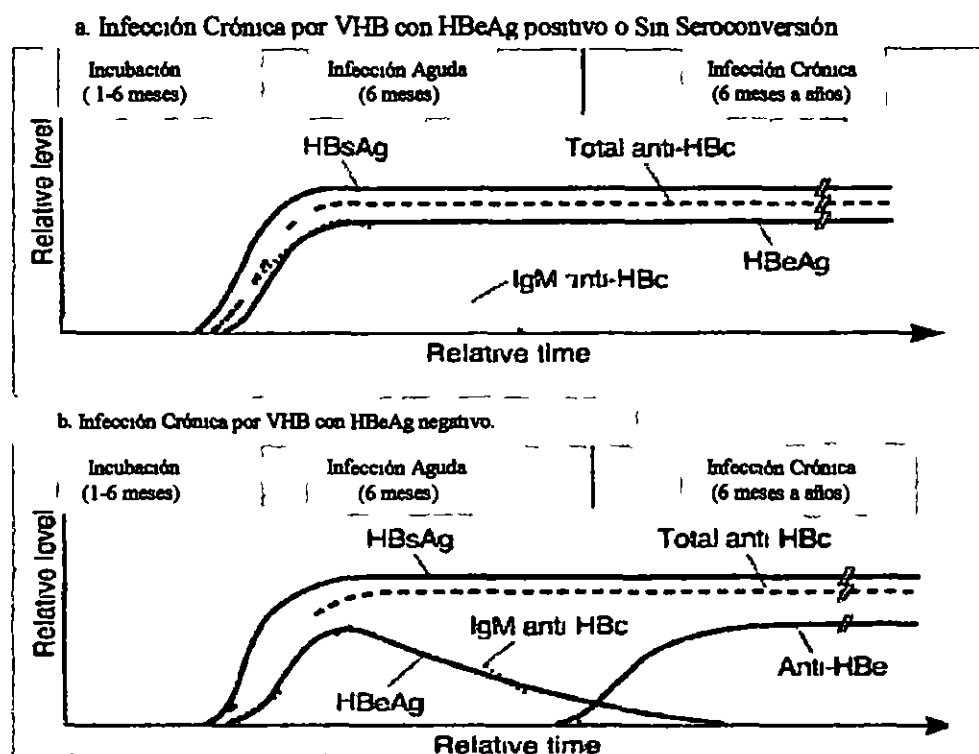
El primer estado o fase inmuno tolerante se caracteriza por altos niveles de ADN de VHB positividad para el antígeno e (HBeAg) y niveles normales de transaminasas séricas En el niño o adulto agudamente infectado este estado representa el periodo de incubación antes de la respuesta inmune para el VHB En neonatos el estado inmuno tolerante puede durar de años a décadas

El segundo estado refleja la respuesta inmune en el cual hay un proceso inflamatorio que resulta en la destrucción de células infectadas por el VHB y niveles elevados de transaminasas

El tercer estado es el de portador inactivo se piensa que marca el final de la replicación viral activa El HBeAg está negativo aparecen los anticuerpos contra el antígeno e (anti HBe) indicando seroconversión y los niveles de las transaminasas se normalizan Ver Fig 6b Un bajo nivel de ADN de VHB puede estar presente La mayoría de los adultos

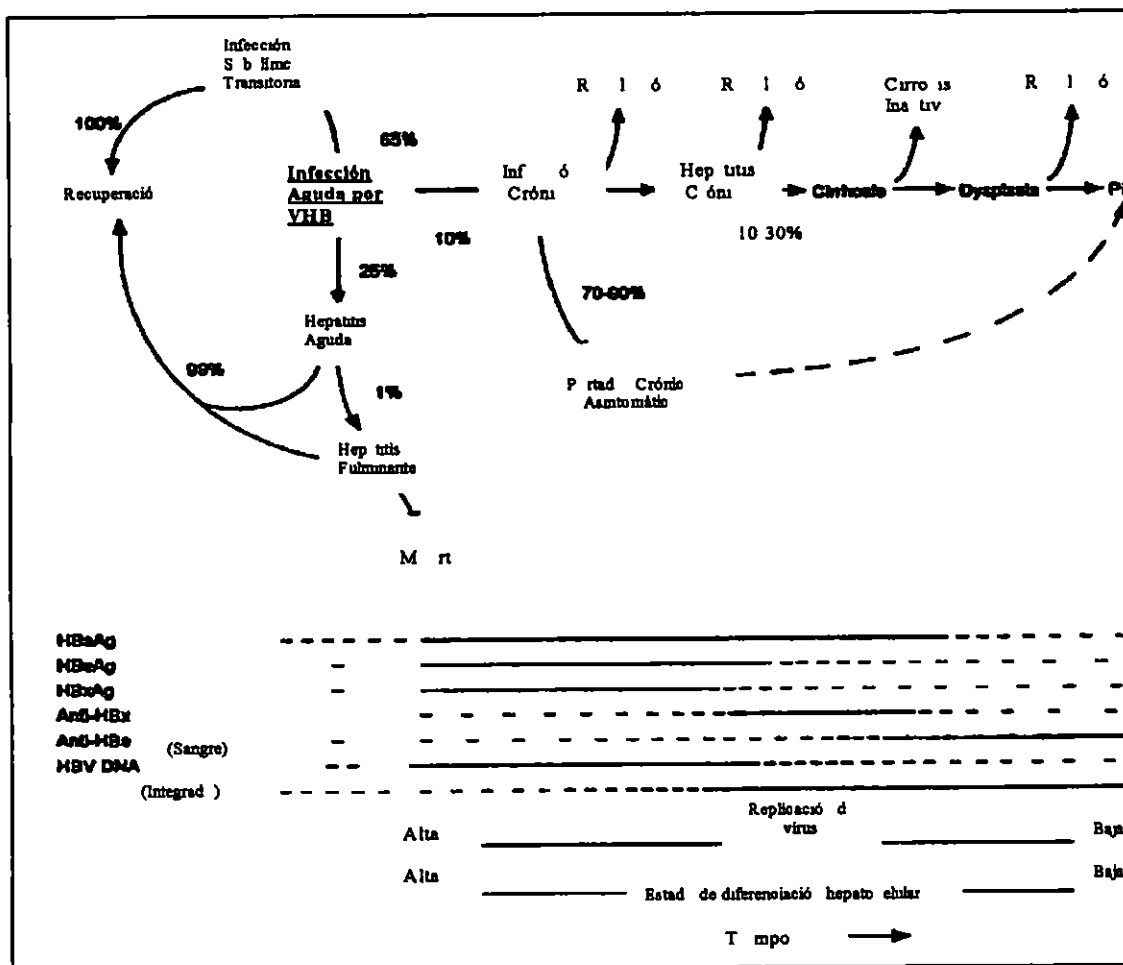
con infección aguda entran en este estado rápidamente. En la mayoría de los neonatos crónicamente infectados y en algunos niños y adultos la tasa de seroconversión es de 5 a 15% por año. Una tasa más alta está asociada con el incremento en edad y niveles elevados de ALT.

El cuarto o estado inmune se caracteriza por la clarificación del HBsAg. El ADN de VHB es usualmente indetectable y la reactivación o reinfección son poco comunes. La progresión del tercer al cuarto estado ocurre en aproximadamente un 3% de las personas infectadas con VHB por año.



**Fig 6a y 6b** Esquema que explica dos formas de infección crónica por VHB (sin seroconversión (HBeAg +) y con seroconversión tardía (HBeAg (-)) y el tiempo de aparición relativo de los marcadores

[www.cdc.gov/spanish/enfermedades/Hepatitis.htm](http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/Hepatitis.htm)



**Figura 7 Explica la historia natural de la infección por VHB en adultos**

*La infección aguda es casi siempre transitoria y subclínica pero arriba del 25% de los pacientes la infección resulta en hepatitis aguda*

*Aproximadamente el 90% de los agudamente infectados se recuperan mientras que el resto desarrollan infección crónica. Estos pueden ser asintomáticos pero del 10-30% desarrollan hepatitis crónica, cirrosis y finalmente carcinoma hepatocelular primario (PHC). El progreso de la enfermedad crónica del hígado puede disminuir o resolverse en cualquier momento durante la infección crónica. Los portadores asintomáticos tienen un riesgo más elevado de desarrollar cáncer hepático que aquellas personas no infectadas (línea cortada). Durante el curso de la infección aguda los marcadores HBsAg, HBeAg y HbxAg y ADN viral pueden aparecer en sangre de forma transitoria (líneas cortadas). La infección crónica se caracteriza por la persistencia de estos antígenos en la sangre por muchos años o décadas (líneas continuas) seguida de la eventual seroconversión hacia anti-HBx y/o anti-HBe. Durante los estados tempranos de la infección crónica la replicación viral es usualmente alta pero los niveles del virus son menores y a veces indetectables en los años seguidos a la seroconversión hacia anti-HBe (Feitelson M 1999).*

**C 3 Complicaciones** Se estima que el 12% de los pacientes con infección crónica por VHB desarrollan cirrosis anualmente y un porcentaje menor desarrolla carcinoma hepatocelular. El riesgo de muerte por cirrosis y carcinoma hepatocelular es del 15 al 25%.

#### **C 3 1 Enfermedad Hepática Crónica (CLD)**

La patogénesis no es efecto directo de la presencia del virus en las células ya que el VHB no es citopático; se debe a la respuesta inflamatoria mediada por el sistema inmune. Esta respuesta resulta en la destrucción y regeneración de las células hepáticas, llevando eventualmente a mutaciones cromosómicas y crecimiento celular acelerado con consecuencias iniciales como la CLD, cirrosis hepática y finalmente el hepatocarcinoma. Bajo muchas circunstancias el VHB no es citopático, indicado por los hallazgos en muchos portadores que tienen carga viral elevada, pero no muestran patología; los inmunosuprimidos muestran muy poca o ninguna patología. Incluso hay estudios en ratones transgénicos que demuestran que el VHB replica en el tejido sin destruir las células invadidas (Farza et al 1988, Araki et al 1991, Guidotti et al 1995). Existen considerables evidencias que la CLD está mediada por la respuesta inmune contra los hepatocitos infectados por el virus (Dudley et al 1972, Mondelli y Eddleston 1984, Feitelson 1989), evidenciada por la presencia de células mononucleares antígeno viral específicas en el hígado y sangre periférica de los pacientes con CLD (Ferrari et al 1987).

#### **C 3 2 Hepatocarcinoma (HCC)**

Es un cáncer de los más frecuentes en el mundo con más de un millón de casos nuevos por año. La tasa de sobrevivencia en 5 años ha sido del 3% y depende de la detección

temprana y la intervencion quirurgica que se logra en la minoria de los casos, ya que no hay marcadores convenientes en higado o suero para identificar a los portadores que probablemente desarrollen HCC

Se cree que una de las razones por las que se desarrolla el HCC es que la proteina HBxAg, una proteina trans-activadora que altera la expresi3n de los genes del hu3sped favoreciendo la patog3nesis de la CLD y el desarrollo del carcinoma hepatocelular asociado a VHB (HCC) Caselman 1995 Henkler y Koshy 1996 Existen varios mecanismos entre los cuales est3 la union del HBxAg a factores de transcripci3n como CREB (proteina de union al elemento de respuesta a AMPc) activando al factor 2 de transcripcion (ATF2) y a otros elementos de la maquinaria basal de transcripci3n actuando el HBxAg como un coactivador a trav3s de estas interacciones con estos elementos Adem3s el HBxAg estimula la actividad de una o mas cinasas celulares como la familia de las tirosin cinasas accionando las vias de transduccion de se3al de las ras raf MAP cinasas y otras vias que pueden alterar el crecimiento celular (Feitelson, 1999) Ver Fig 8

Aun no se conoce con claridad el mecanismo por el cual el VHB causa HCC pero al parecer existen muchas vias moleculares que contribuyen al desarrollo de la HCC asociada a VHB (Feitelson 1999) Otras lineas de investigaci3n pretenden explicar el desarrollo de HCC en portadores cr3nicos a trav3s de un experimento llevado a cabo en un raton transg3nico en donde la sobreexpresi3n de HBsAg en el higado fue directamente toxica para los hepatocitos resultando en cirrosis hepatocelular masiva, regeneracion y eventual desarrollo de HCC (Chisari et al 1987 1989) lo que da un indicio de que la CLD en portadores humanos es debida al efecto toxico del HBsAg la expresi3n



persistente de este en el hígado y el suero combinado con el 'turnover' (regeneración) hepatocelular puede que sea el principal factor de riesgo para desarrollar HCC (Beasley y Hwang, 1984) Para reafirmar el papel del sistema inmune en la patogénesis y desarrollo de HCC en otro estudio se hizo transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos específicos para HBsAg en ratones transgénicos timectomizados irradiados y superproductores de HBsAg resultando en la aparición de hepatitis crónica, seguido por 'turnover' hepatocelular y la aparición de HCC (Nakamoto et al 1998) También se observó otro modelo transgénico caracterizado por la expresión persistente de HBxAg con HCC sin CLD (Kim et al 1991 Koike et al 1994) En conclusión, todos estos estudios en modelos transgénicos tratan de confirmar que el VHB como tal no es citopático in vivo y también sugieren que uno o más antígenos virales como el HBxAg hechos a partir de un templado integrado a las células hepáticas puede contribuir a la hepatocarcinogénesis

### **C 3 2 1 Investigación para el Carcinoma Hepatocelular (HCC)**

La investigación de pacientes con infección crónica por VHB para detectar carcinoma hepatocelular midiendo niveles de alfa fetoproteína o a través de ultrasonografía sigue siendo polémica. El HCC puede desarrollarse de 25 a 30 años después del desarrollo de la infección crónica sin embargo ocasionalmente aparece más temprano y los hombres están en mayor riesgo que las mujeres.

No se han llevado a cabo ensayos en pacientes con infección crónica por VHB para determinar si su detección temprana y la resección de tumores hepáticos tienen algún efecto sobre la mortalidad. No obstante la AASLD recomienda la investigación de

tumores hepáticos cada seis meses cuando existe una infección crónica en hombres de 45 años con cirrosis y en pacientes con historia familiar de HCC

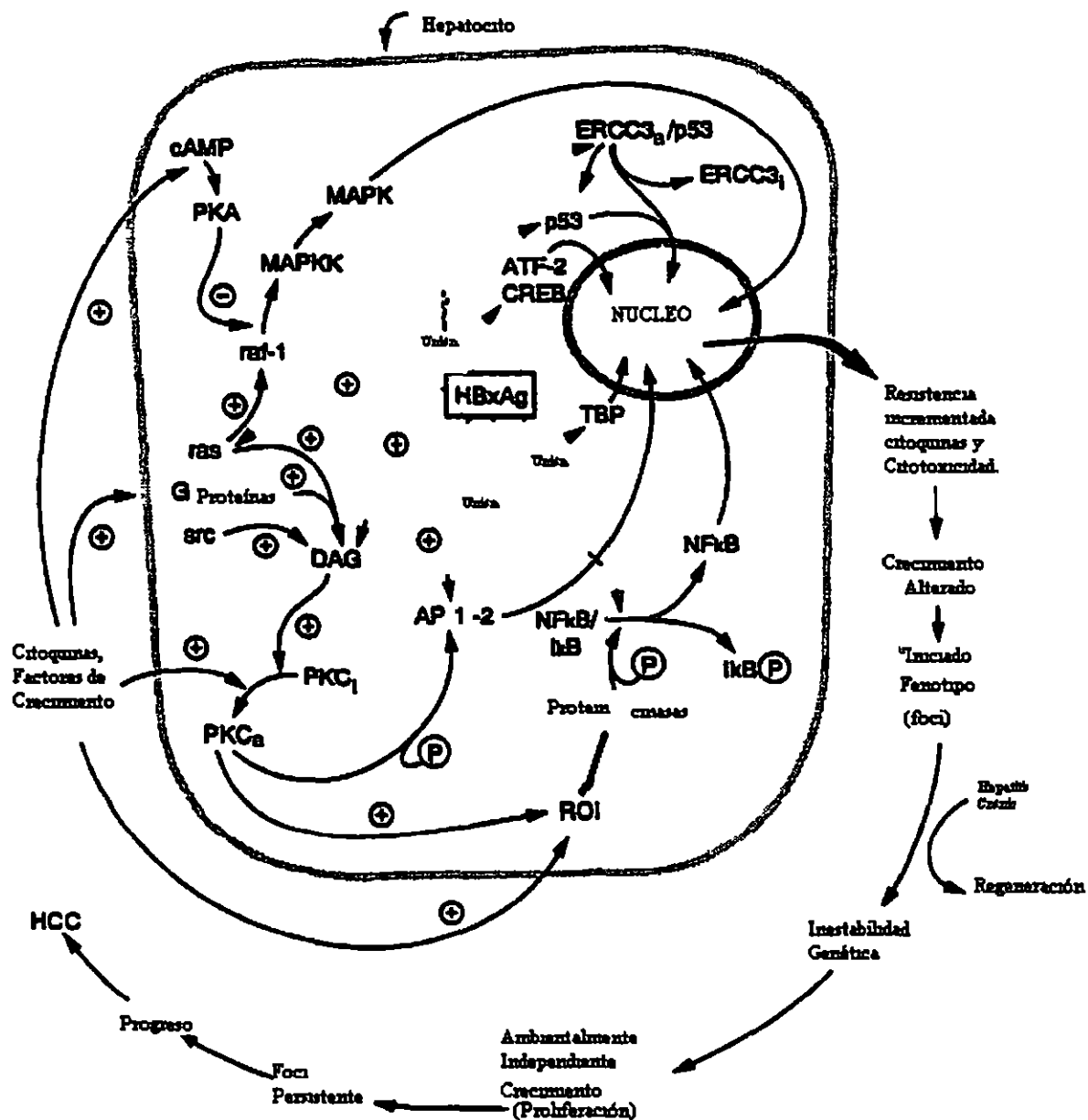


Fig 8 Muestra la interacción del HBxAg con los factores de transcripción, proteínas y factores de crecimiento del hepatocito lo que contribuye a la alteración de la bioquímica celular dando como consecuencia el Hepatocarcinoma celular (HCC) (Feitelson M 1999)

## **D DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

### **D 1 Pruebas químicas**

Para valorar la función hepática se utilizan habitualmente tres pruebas sanguíneas que incluyen la bilirrubina y las enzimas específicas ALT y AST

Los niveles sanguíneos de estas tres sustancias se elevan en proporción aproximada al grado de daño hepático ALT y AST están contenidas dentro de las células hepáticas La inflamación del hígado hace que estas enzimas sean liberadas en la sangre en cantidades anormalmente altas Un resultado elevado en las pruebas de una o de todas estas sustancias a menudo es la primera indicación de que el paciente presenta una inflamación del hígado y es generalmente el primer paso para establecer el diagnóstico de hepatitis (Abbott Científica)

Los niveles de transaminasas se elevan durante la fase de respuesta inmune debido al proceso inflamatorio que resulta en la destrucción de células infectadas por el VHB

### **D 2 Pruebas Serológicas**

#### **D 2 1 Técnicas Disponibles para la Detección de Antígenos y Anticuerpos del VHB**

##### **D 2 1 1 Prueba de ELISA Convencional**

Es un ensayo inmunoenzimático que evidencia una reacción Antígeno Anticuerpo mediante la formación de un producto coloreado que se mide espectrofotométricamente y cuyo valor se interpretará ya sea directa, si el ensayo es de tipo sandwich o directo en donde la concentración de antígeno o anticuerpo presente en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia leída por el espectrofotómetro a una longitud de onda que

va de 620 690 nm e inversa, si el ensayo es de tipo competitivo en donde la concentración de antígeno o anticuerpo presente en la muestra sera inversamente proporcional al valor de absorbancia obtenido en el espectrofotometro

#### Elementos necesarios para una prueba de ELISA

- Soporte plástico con pocillos de poliestireno con antígenos o anticuerpos inmovilizados
- Antígenos recombinantes y anticuerpos monoclonales marcados
- Sustrato
- Buffer de lavado
- Solucion de parada ( $H_2SO_4$ )
- Controles negativos y positivos

Se han desarrollado multiples variantes de ensayos ELISA que permiten la cuantificación de un antígeno en solucion y la detección de un anticuerpo en una solucion

Entre ellos estan

- a ELISA Indirecto Las placas ELISA estan recubiertas con antígeno recombinante. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la union de dos o mas anticuerpo secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular.

b ELISA “sandwich” (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos) Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti antígeno. Se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo al menos que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Estos ensayos son muy utilizados sin embargo son laboriosos y requieren de varios equipos como el lavador de platos de ELISA, el lector de platos de ELISA, el incubador para placas y un reloj para seguir los tiempos de incubación.

c Ensayos Inmunoenzimáticos (EIA) Automatizados

Existen en el mercado diversos equipos automatizados con distintos principios para detectar antígenos y anticuerpos los cuales son útiles en el manejo de grandes volúmenes de muestras como las que se manejan actualmente en los Bancos de Sangre de nuestro país. Mencionaremos algunos y se describirá con más detalle el ensayo de quimioluminiscencia amplificada del equipo Vitros Eci, que utilizamos en la Fase Serológica del estudio.

Entre los ensayos disponibles están

- MEIA, en equipos IMX y Axsym
- Electroquimioluminiscencia, en equipo ELECSYS
- Quimioluminiscencia amplificada en equipo Vitros Eci

#### **D 2 1 2 Principio de Quimioluminiscencia Amplificada**

Las reacciones de quimioluminiscencia son reacciones de oxidación en las cuales los compuestos orgánicos son excitados por oxidación con oxígeno o peróxido de hidrógeno

En la Quimioluminiscencia Amplificada, hay elementos como la peroxidasa de rábano que está marcada, un prolongador que actúa como catalizador y que incrementa hasta 1000 veces la velocidad de oxidación del luminol por la peroxidasa de rábano. Ver Fig 9

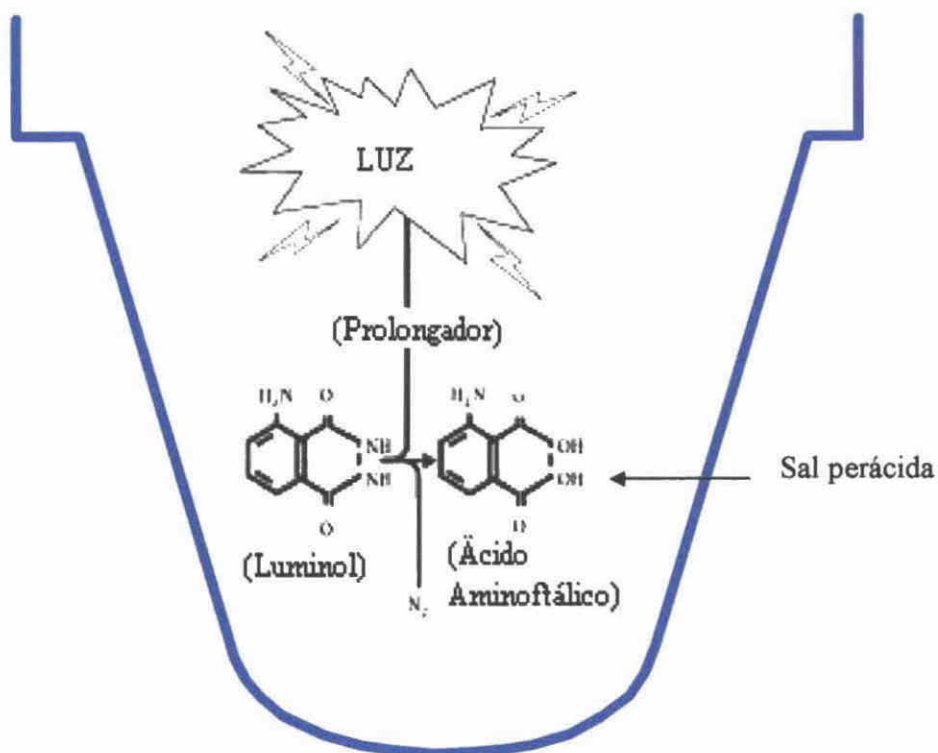
En el caso de los reactivos que detectan *antígenos* como el de Superficie y el antígeno e del VHB es una técnica inmunométrica, que implica la reacción simultánea del antígeno presente en la muestra con un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado y un anticuerpo monoclonal de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) en el conjugado. El complejo inmune es capturado por la estreptavidina presente en los pocillos. Los materiales no fijados se eliminan mediante lavados.

El conjugado de HRP fijado se mide por una reacción luminiscente. Se añade a los pocillos sustratos luminogénicos que contienen un reactivo (un derivado de luminol y una sal perácida) y un agente de transferencia de electrones. La HRP en el conjugado fijado cataliza la oxidación del derivado de luminol y produce luz. El agente de

transferencia de electrones (una acetilida sustituida) incrementa el nivel de luz producido y prolonga su emision Las señales luminicas son leidas por el Sistema Vitros La cantidad de conjugado HRP fijado es directamente proporcional a la concentracion de antígeno presente en la muestra.

En el caso de la medicion de *anticuerpos* contra el Antígeno e y contra el core es un ensayo competitivo que implica la pre-incubación del anticuerpo presente en la muestra con un antígeno fijo en el Reactivo del Test seguido de una incubacion con un Reactivo de Conjugado que contiene un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado y un anticuerpo monoclonal de ratón marcado con HRP El complejo inmune es capturado por la estreptavidina presente en los pocillos Los materiales no fijados se eliminan mediante lavados

El conjugado de HRP fijado se mide por una reacción luminiscente Se añade a los pocillos substratos luminogénicos que contienen un reactivo (un derivado de luminol y una sal perácida) y un agente de transferencia de electrones La HRP en el conjugado fijado cataliza la oxidacion del derivado de luminol y produce luz El agente de transferencia de electrones (una acetilida sustituida) incrementa el nivel de luz producido y prolonga su emision Las señales luminicas son leidas por el Sistema Vitros La cantidad de conjugado HRP fijado es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo presente en la muestra



**Fig.9** Describe en parte la reacción de quimioluminiscencia amplificada. Tomado de: Q.F.B. Raul Munguia y Representante De Ventas Asesor Técnico. Ortho Clinical Diagnostics. Johnson & Johnson Medical Mexico S.A De C.V.

Elementos necesarios para una prueba de quimioluminiscencia amplificada:

1. Equipo Vitros Eci (tiene un luminómetro, el cual mide la emisión de luz)
2. Reactivos con pocillos recubiertos con estreptavidina, y con botella de conjugado.
3. Reactivo de señal, que contiene luminol y una sal perácida.

Los demás elementos se describen en la tabla 3 en Anexos.



La técnica de quimioluminiscencia amplificada en el Equipo Vitros Eci es altamente sensible y confiable cuenta con Criterio Técnico Aprobado y a nivel internacional las pruebas de hepatitis para los Bancos de Sangre en este equipo están aprobados por la FDA.

#### **D 2 2 Marcadores Serológicos**

Las técnicas serológicas actuales permiten detectar en los pacientes infectados los antígenos del VHB y la respuesta de anticuerpos frente a dicha infección con distintos grados de sensibilidad y especificidad Su determinación cualitativa y cuantitativa nos permite realizar un diagnóstico establecer un pronóstico fiable de la infección con o sin tratamiento y conocer la susceptibilidad de la población a la infección por VHB (prevención) Los métodos serológicos utilizados habitualmente en los laboratorios del país para determinar los marcadores de hepatitis B (HBsAg, anti HBc y anti HBs) se basan en la tecnología del inmunoensayo enzimático (EIA) Suelen utilizarse sobretodo técnicas de EIA tipo *sandwich* y EIA competitivo

A continuación se describirán los marcadores serológicos que se pueden detectar en los laboratorios y Bancos de Sangre de Panamá

##### **D 2 2 1 Antígeno de Superficie (HBsAg)**

Es indicativo de infección aguda y también del estadio crónico es uno de lo mas comunmente detectados en los laboratorios y en los bancos de sangre del país para el diagnostico de hepatitis B En ciertas ocasiones pueden presentarse falsas reacciones positivas al HBsAg (reacciones inespecificas) que deben confirmarse con la realización

de técnicas de neutralización con anti HBs. Sin embargo la reactividad aislada para HBsAg puede deberse a otros motivos como

- Inmunotolerancia extrema

Estadio precoz de la infección aguda por VHB

Infección por cepas de VHB defectuosas en la expresión del HBxAg con niveles de ADN vírico detectable solo por PCR.

- Infección por VHB tipo 2 este tipo se diagnostica por métodos de EIA que detecten niveles de HBsAg inferiores a 0.4 ng/ml o bien por técnicas de hibridación y PCR.

#### **D 2 2 2 Antígeno de la capsida (HBcAg)**

Existen métodos para la detección de este marcador sin embargo no es común su determinación y en Panamá no están disponibles

#### **D 2 2 3 Anticuerpo anti HBc**

Este marcador es uno de los que se determina en los Bancos de Sangre de Panamá en el tamizaje de las unidades donadas y desde que se inició su determinación en el año 2000 es el que con mayor frecuencia ha presentado positividad de todos los marcadores de agentes infecciosos que se determinan

Es el primer anticuerpo que aparece en la infección por el virus y persiste años después de la recuperación. La presencia de anticuerpos de la clase IgM frente a este marcador se interpreta habitualmente como indicador de infección reciente aunque sabemos que también es detectable en la infección crónica con replicación viral. La detección de los

anticuerpos de tipo IgM es poco comun ya que estan presentes por muy poco tiempo en el suero del paciente Ver Fig 10

En ocasiones se detecta en el suero de los pacientes una reactividad aislada para anti HBc en ausencia de otros marcadores de infeccion por VHB lo que puede deberse a

*Reaccion inespecifica ligada a componentes sericos La especificidad debe confirmarse por otra tecnica serologica de distinto principio la deteccion de anticuerpos anti HBe o la presencia del ADN virico*

Periodo de ventana de la infeccion por VHB

Respuesta inmunitaria incompleta al VHB

La presencia aislada de anticuerpos anti HBc no confiere inmunidad a la reinfeccion y no constituye por tanto un criterio de exclusion para la vacunacion

#### **D 2 2 4 Antigeno e (HBeAg)**

Es un marcador de infectividad y replicacion que debe manejarse conjuntamente con los anticuerpos anti HBe y la deteccion del ADN viral Los pacientes con reactividad al HBeAg tienen entre 10<sup>5</sup> 10<sup>8</sup> Equivalentes de genoma/ml (gE/ml) Es un marcador dificil de detectar debido a su corta duracion en sangre durante la fase aguda de la infeccion

#### **D 2 2 5 Anticuerpo anti HBe**

Su aparición en una infeccion aguda indica buena evolucion En general se detecta antes de que desaparezca el HBsAg y persiste varios anos despues de la infeccion En los casos de infeccion crónica, en los que coexiste con el HBsAg suele indicar escasa replicacion e infectividad (portador asintomatico o hepatitis cronica persistente) Sin embargo como

ya se ha comentado la seroconversión anti HBe no siempre indica mejoría, sino que puede deberse a la selección de mutantes Pre-C del VHB que se asocian a alta replicación virica con cuadros de hepatitis crónica activa y cirrosis

#### **D 2 2 6 Anticuerpo anti-HBs**

Es el último marcador en aparecer indicando recuperación de la enfermedad persistiendo durante años. Estos anticuerpos son neutralizantes y confieren protección frente a la infección por VHB.

Es el único marcador que detectamos en los individuos vacunados. Al igual que en el caso del HBsAg se ha descrito un patrón serológico poco frecuente de reactividad aislada para anti HBs en individuos no vacunados (0.1%-0.5%) pudiendo deberse a reacciones serológicas inespecíficas que pueden confirmarse por métodos de neutralización o bien por una respuesta inmunitaria incompleta frente a la infección por VHB. Asimismo se ha documentado la coexistencia de anti HBs y HBsAg. Este patrón de reactividad puede ser debido a

Infección por variantes del VHB defectuosas de escape en sujetos previamente vacunados o en pacientes en tratamiento con interferón

Infección por el VHB tipo 2 en individuos inmunes al VHB

- Fenómenos de tolerancia inmunológica

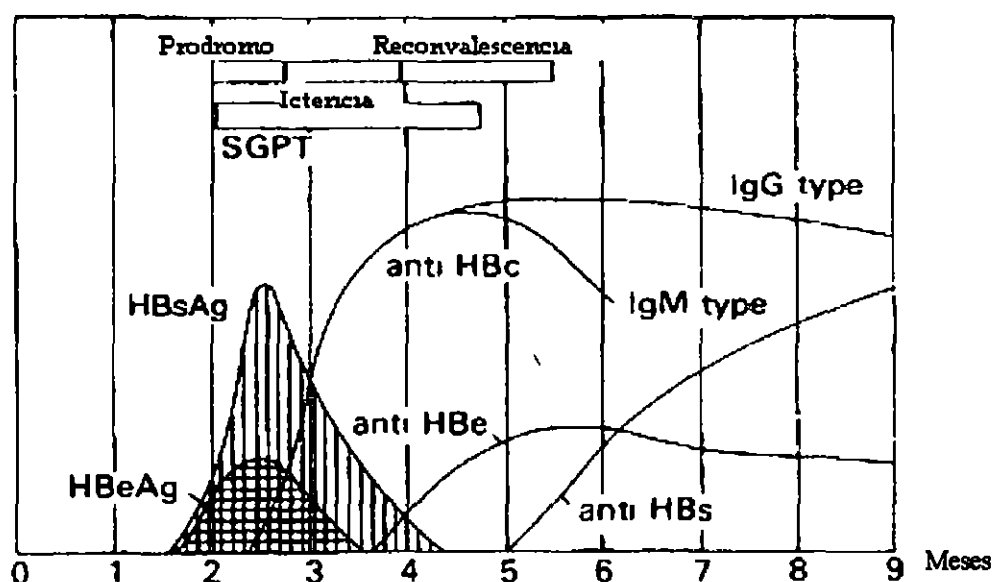
Administración de gammaglobulina específica a un paciente portador del HBsAg

La introducción de la vacunación para VHB y su monitorización hizo necesario el desarrollo de técnicas serológicas cuantitativas anti HBs. La mayoría de los métodos inmunoenzimáticos comerciales incorporan un panel anti HBs de cuantificación. El

panel incluye habitualmente 5 o 6 estándares que contienen una concentración creciente y conocida de un policlonal humano anti HBs expresada en mUI/ml. Los resultados de las muestras estudiadas en el mismo ensayo se comparan con los valores de una curva de calibración estándar obtenida a partir del panel de cuantificación.

Títulos superiores a 10 mUI/ml de anti HBs se consideran protectores, sin embargo se recomienda la revacunación con títulos anti HBs comprendidos entre 10 y 100 mUI/ml. Se puede estimar el periodo de tiempo que dura la protección frente al VHB conociendo el título de anti HBs tras la última dosis de la vacuna.

- Si es inferior a 100 mUI/ml, la protección es de aproximadamente 6 meses
- Entre 100 y 1000 mUI/ml, la protección es de 2 años
- Entre 1000 y 10000 mUI/ml la protección es de 3 a 5 años
- Cuando el título es superior a 10000 mUI/ml, la protección se prolonga más allá de 6 años



**Figura 10** Describe la aparición de los distintos marcadores serológicos durante una infección por VHB según el número de semanas transcurridas  
<http://googleimages.com>

**Tabla 5: Interpretación de las Pruebas para el Virus de Hepatitis B:**

<b><u>Prueba</u></b>	<b><u>Resultado</u></b>	<b><u>Interpretación</u></b>
HBsAg	Negativo	Susceptible (No inmune) a la infección por VHB.
Anti-HBc	Negativo	
Anti-HBs	Negativo	
HBsAg	Negativo	Inmune debido a infección natural
Anti-HBc	Positivo	
Anti-HBs	Positivo	
HBsAg	Negativo	Inmune debido a la vacuna por Hepatitis B
Anti-HBc	Negativo	
Anti-HBs	Positivo	
HBsAg	Positivo	Infección Aguda por VHB
Anti-HBc	Positivo	
IgM anti-HBc	Positivo	
Anti-HBs	Negativo	
HBsAg	Positivo	Infección Crónica por VHB
Anti-HBc	Positivo	
IgM anti-HBc	Negativo	
Anti-HBs	Negativo	
HBsAg	Negativo**	**Cuatro Posibles Interpretaciones
Anti-HBc	Positivo	
Anti-HBs	Negativo	

**\*\*** 1) Paciente en recuperación de una infección aguda. 2) Paciente que haya disminuido su nivel de anticuerpos contra VHB (anti-HBs), se hacen indetectables con las pruebas. 3) Falso positivo de anti-HBcore. 4) Niveles indetectables en el suero de HBsAg y el paciente es un portador.

**Fuente:** <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/b/Bserology.htm>

### **D 3 Pruebas Moleculares**

#### **D 3 1 Determinacion de ADN del virus de la Hepatitis B (ADN VHB)**

Los investigadores han desarrollado ensayos que detectan y determinan con exactitud el ADN del VHB. Estos ensayos detectan el genoma virico y determinan el nivel de virus circulante en los individuos infectados. La determinacion del (ADN VHB) es el marcador más sensible y específico de replicación del VHB. Se detecta en mas del 85% de los pacientes con HBeAg y se correlaciona de forma directa con el HBcAg hepatico. El ADN virico libre en el suero puede detectarse mediante tecnicas comerciales de hibridacion (en solucion) sensibles y rapidas, ensayos de hibridacion del ADN ramificado (Quantiplex Chiron) con un limite de deteccion de  $7 \times 10^5$  gE/ml y por amplificacion mediante PCR y Nested PCR. En este estudio se utilizaran primers que amplifican la region invariable del core del VHB para la amplificacion por PCR y Nested PCR.

#### **D 3 1 1 Técnica de PCR**

De todas las tecnicas disponibles para el analisis de ADN y ARN ninguna ha tenido el impacto o tiene el potencial de la reaccion en cadena de la polimerasa. La PCR puede selectivamente amplificar una molécula única de ADN o ARN generando miles de copias en pocas horas.

La PCR esta basada en la amplificacion enzimatica de un fragmento de ADN que esta flanqueado por dos cebadores oligonucleotidos cortos que hibridizan los extremos opuestos de una secuencia blanco e inician la sintesis de la secuencia complementaria de ADN por medio de la enzima ADN polimerasa. Los cebadores se orientan de forma tal

que las dos nuevas hebras de ADN son complementarias entre ellas y efectivamente se crea una segunda copia de la secuencia blanco original. Repetidos ciclos de desnaturalización por calor, hibridización de los cebadores y síntesis enzimática del ADN resultan en la amplificación exponencial (2 4 8 16 32 copias) de la secuencia blanco de ADN. Con el uso de los termocicladores, una serie de amplificación toma cerca de 10 minutos. En solo unas pocas horas, muchos millones de copias de la secuencia inicial pueden ser creadas, una cantidad suficiente que permite estudiar fácilmente la región de interés (Cano E, Pinto J C, 2001).

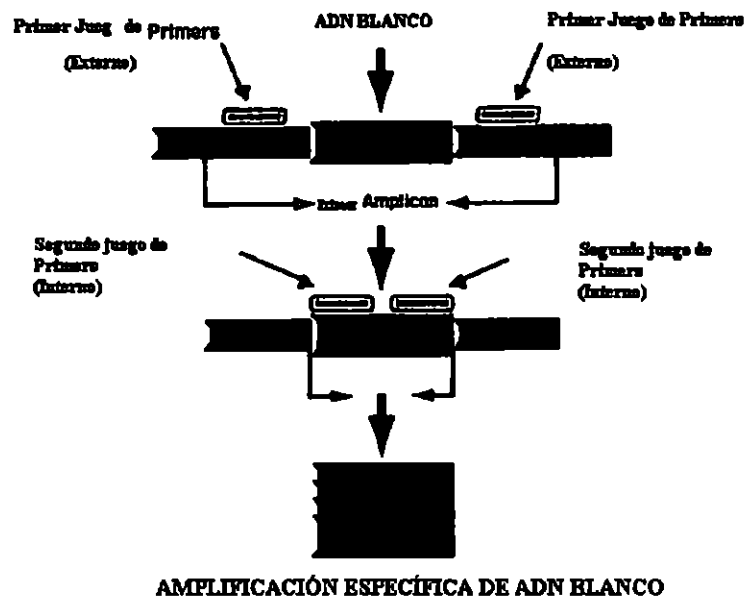
Estudios como los de Wong D et al, 2004, realizados con la técnica de COBAS Amplicor HBV Monitor Test, demuestran que existe una fuerte correlación entre los niveles de ADN de VHB intrahepático con los niveles en el suero de los pacientes; esta información, con la de muchos otros estudios (Gutierrez C et al, 1999, 2001, 2004), demuestran que la muestra de suero es apropiada para la búsqueda de ADN VHB.

### **D 3 1 2 Nested PCR, (PCR anidada)**

Es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores o primers en cada una con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos (PCR) para amplificar una región de ADN más extensa que contiene el segmento diana (de interés). Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica. Ver Fig 11.



El método de la PCR interna se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con la PCR clásica, dado que en cada etapa se realiza un número menor de ciclos (las PCR de muchos ciclos conllevan a menudo errores de lectura y de síntesis debido entre otras cosas a la falta de fidelidad de la polimerasa Taq). Además, si el producto de la primera PCR es el resultado de una amplificación inespecífica, el segundo par de cebadores internos no reconocerá la secuencia complementaria, y por consiguiente no habrá amplificación.



**Fig 11** Explica la unión del primer juego de cebadores en la porción externa de la región de interés y la posterior amplificación con un segundo juego de cebadores que genera una amplificación más específica de la región de interés [http:// googleimages.com](http://googleimages.com)

El uso de la PCR y Nested PCR para el estudio de la infección por VHB ha sido ampliamente reconocido e implementado por diversos autores como Liang TJ et al 1989 Bréchet C 1993 Gutierrez C et al ,2001 y Zaaijer H L et al 1994 los cuales afirman que es una técnica altamente sensible para la detección de ADN VHB en suero tejido hepático y células mononucleares de sangre periférica

El ADN VHB se ha encontrado en donantes de sangre con ningún marcador serológico positivo para VHB (Bréchet C 1993 Carman WF 1990 Liang TJ 1990)

### **D 3 1 3 Carga Virica**

El nivel de ADN del VHB en la sangre se conoce como carga vírica de VHB

Las aplicaciones en el campo de la investigación de los ensayos de ADN del virus de la hepatitis B incluyen

- Estimar directamente el virus circulante en un individuo infectado
- Predecir la respuesta al interferón (los pacientes con cargas víricas bajas pretratamiento tienen más probabilidades de responder)

Monitorear la eficacia de la terapia antivírica (el ADN del VHB desciende rápidamente en pacientes que responden al tratamiento)

- Proporciona información adicional para ayudar a confirmar un diagnóstico en los casos con serología ambigua.

Si un medico puede determinar la carga virica, decidirá con mayor certeza si debe iniciar o no la terapia, ademas de poder monitorizar sus efectos con mayor exactitud (Abbott Cientifica)

Actualmente en nuestro pais contamos en el ICGES y en el CHMAAM con el equipo Cobas Amplicor el cual permite amplificar y cuantificar el nivel de ADN VHB presente en una muestra de suero y plasma.

#### D 3 1 3 1 Analisis Cuantitativo Automatizado de ADN VHB usando Cobas Amplicor HBV Monitor Test

El analisis cuantitativo de ADN VHB involucra una PCR y calcula el numero de copias de material genético por ml de muestra del paciente Para realizar este analisis se necesita el kit Cobas Amplicor HBV Monitor Test y el equipo o sistema Cobas Amplicor además el laboratorio debe contar con un área de pre-PCR, en donde se preparan los reactivos y se preparan las muestras y un area de post PCR de amplificación y deteccion

El sistema Cobas Amplicor combina 5 instrumentos diferentes en una misma plataforma, que realizan las tareas de amplificacion (2 termocicladores) deteccion pipeteo y lavados

#### D 3 1 3 2 Principios generales de la Prueba Cobas Amplicor

- **Amplificacion Selectiva** Hay una amplificacion selectiva del acido nucleico objetivo de la muestra que se consigue con el uso de la enzima AmpErase (uracil N glucosilasa) y la deoxiuridina trifosfato (dUTP) en la prueba Cobas Amplicor

**HBV Monitor** Esta enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen deoxiuridina pero no de las que contienen deoxitimidina

La deoxiuridina no está presente en el ADN natural pero siempre está presente en el amplicón debido al uso de dUTP entre los dNTP del reactivo de mezcla maestra por lo tanto el amplicón contiene deoxiuridina

Si existiese un amplicón contaminante de alguna amplificación anterior la AmpErase lo destruiría antes de comenzar el primer ciclo de amplificación del ADN objetivo. La AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55 °C es decir durante los pasos del ciclo térmico y por consiguiente no destruye el amplicón objetivo

Lo anterior se considera como un sistema de control de calidad dentro de la mezcla maestra

La Mezcla Maestra o Master Mix contiene lo siguiente

- 1 Taq DNA Polimerasa
- 2 AmpErase®
- 3 dCTP dGTP dUTP y dATP
- 4 Glicerol
- 5 Tampon TRIS
- 6 Iniciadores o Primers HBV 104UB y HBV 104D (HBV 104UB está biotinilado)

### **Controles de Calidad**

Los kits Amplicor poseen cuatro controles de calidad

- 1 QS Estandar de cuantificacion (cuantitativo) IC (cualitativo)
- 2 CN-Control Negativo
- 3 Control Positivo Bajo
- 4 Control Positivo Alto

Y el Eliminador de Contaminantes de Acarreo AmpErase

### **E RESPUESTA INMUNOLÓGICA A LA INFECCIÓN POR ELVHB**

La relacion presente entre respuesta inmunitaria y la expresion clinico patologica durante la infeccion por el VHB ha sido tema de muchas investigaciones El sistema inmunitario actua en enfermedades infecciosas a través de celulas linfoides y de secrecion de citocinas

La respuesta inmunitaria antiviral en diferentes tipos celulares (celulas T celulas B y celulas del sistema monocito/macrófago) puede ser especifica o no al antígeno

La respuesta especifica para el VHB esta determinada por

- la produccion de anticuerpos anti VHB por las celulas B
- la presencia de celulas T citotoxicas especificas del VHB

La respuesta inmune no específica (modulación de las citocinas y sus receptores) coexiste con la respuesta específica (Chisari y Ferrari 1995)

En los pacientes portadores crónicos Ferrari et al 1990 Kakumu et al 1991 Tsutsumi et al 1990 han demostrado que la producción in vitro de los anticuerpos contra el HBcAg puede ser dependiente o no de células T. Por el contrario la respuesta a los HBeAg es solamente dependiente de células T. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> secretan proteínas efectoras citotóxicas como perforina y granzyme o citocinas IFN- $\gamma$  TNF  $\alpha$  y TNF  $\beta$  entre otras.

Los antígenos de la nucleocápside (HBcAg y HBeAg) del VHB han sido demostrados asociados a la lisis hepatocelular dependiente de la inmunidad celular T en los portadores crónicos. Estos antígenos están reconocidos por líneas de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. De estas reacciones cruzadas se ha observado una inducción de líneas celulares T CD4<sup>+</sup> el HBcAg determina una respuesta similar al HBeAg y de forma similar las líneas T CD8<sup>+</sup> inducidas por el HBeAg son también capaces de responder al HBcAg (Ishisawa et al 1991). Se produce una respuesta proliferativa intensa de las células T inducida por los antígenos de la nucleocápside (HBeAg/HBcAg) por la vía inmunodominante de 20 aminoácidos localizados en la parte N terminal de la proteína del core. Otras dos secuencias adicionales importantes han sido identificadas en la región N terminal y en la mitad aminoterminal de la molécula del core; estas secuencias son capaces de inducir significativamente proliferación de células T en aproximadamente el 70% de los pacientes estudiados. La identificación de los epítopes reconocidos por las células T en la molécula del core constituyen la base molecular de la patogénesis viral (Ferrari et al

1991) Otro estudio ha permitido determinar un sitio de reconocimiento por las células T en pacientes infectados por el VHB situado entre los residuos 72 y 146 de la proteína del core. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de esos pacientes presentan un aumento significativo de la producción del IFN  $\gamma$  y de la respuesta proliferativa en presencia del HBcAg recombinante (Ishikawa et al 1992)

### E 1 VHB y Citoquinas

Las citocinas son complejos de moléculas asociadas a la regulación de la respuesta inmune y de la homeostasis de órganos. Las citocinas intervienen en los procesos fisiológicos y patológicos del hígado (la regeneración, el crecimiento hepático y los procesos inflamatorios tales como enfermedades virales, fibrosis y cirrosis hepática). La respuesta celular juega un papel central en la necrosis hepatocelular y en los mecanismos inmunopatogénicos permitiendo la eliminación o la persistencia viral. Es por esta razón que la respuesta mediada por las citocinas secretadas por las células T ejercen su actividad por mecanismos citopáticos y no citopáticos (Chisari y Ferran 1995). Las citocinas pro inflamatorias (IL 1, IL 6 y TNF- $\alpha$ ) juegan un rol muy importante en los pacientes infectados por el VHB. Se ha demostrado que estas citocinas aumentan en forma persistente en el plasma durante la hepatitis aguda, las cuales no son detectadas en el estado crónico de la enfermedad (Torre et al 1994). Contrariamente Ozeki et al (1990) demuestran una producción elevada de la interleucina 1 (IL 1) en los enfermos crónicos. La IL 6 ha sido encontrada aumentada en el plasma de los pacientes infectados crónicamente por el VHB (Neurath y col 1992). Se ha demostrado que ciertas citocinas pro inflamatorias como el TNF  $\alpha$  (Sheron et al 1990) y la IL 1 (Kakumu et al 1993)

inducen un aumento en la producción de la IL-6 en el plasma de pacientes con hepatitis B crónica. In vitro Oquendo et al (1996) utilizando varios inóculos provenientes de pacientes con infección crónica, demostraron que el VHB ejerce un efecto inhibitorio sobre la transcripción de los genes de la IL-1 $\beta$  de la IL-6 y del TNF  $\alpha$ , favoreciendo una integración rápida del ADN del VHB en el genoma de las células monocitarias. Contrariamente el VHB aumentó la expresión del TNF  $\alpha$  en células B con patrón de integración diferente (Oquendo et al 1997).

En general a pesar de los hallazgos de algunos autores en pacientes con infección crónica, se puede resumir que la IL-6, el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y la IL-2 están aumentadas en el plasma durante la hepatitis viral aguda, y contribuyen a la aparición de lesiones citotóxicas y pro inflamatorias en el hígado. Las células Th CD4<sup>+</sup> han sido bien caracterizadas en dos sub poblaciones funcionales Th1 y Th2 (Monsman et al 1986) que producen diferentes citoquinas.

El fenotipo Th1 produce IL-2, IFN  $\gamma$ , IL-12 y el TNF  $\beta$  y el fenotipo Th2 produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 (Paul y Seder 1994). Estudios han sido realizados en los pacientes con hepatitis crónica para evaluar los fenotipos Th1 y Th2. Se ha demostrado que las interleucinas del fenotipo Th1 regulan positivamente y el fenotipo Th2 negativamente la inflamación hepática crónica (Fukuda et al 1995). En ese tipo de enfermedad la disminución de la síntesis de la IL-2 y de IFN  $\gamma$  en los hepatocitos determina un aumento de la tasa sérica de IL-1 y del receptor soluble de la IL-2 (Misailes et al 1995).



Las células CD4<sup>+</sup> que expresan los marcadores CD56 han sido purificadas a partir de biopsias del hígado de enfermos con hepatitis crónica activa. Estas células presentan una fuerte actividad citotóxica y el 25-40% expresan sobre su superficie los marcadores CD56 que sugieren que 1) ellas presentan un perfil de producción de citoquinas tipo TH1 2) ellas pueden estar identificadas por la expresión del marcador CD56 y 3) la expansión de estas células puede ser facilitada por la estimulación antigénica en la ausencia de fenómenos inflamatorios en el hígado. Las células CD4<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> juegan un papel en la inmunopatogénesis de la infección por el virus de la hepatitis B (Baranaba et al 1994).

La respuesta inmunitaria mediada por células ha sido caracterizada en los ratones transgénicos para los antígenos de la nucleocápside (HBc y HBeAg) y los resultados indican que la respuesta es de tipo Th1. Esta respuesta está inducida por péptidos de 12 aa que representan los sitios antígenicos específicos de las células de estos ratones transgénicos B10.S (120-131) y B10 (129-140) (Milich et al 1995).

Neurath et al (1992) demuestran que la IL-6 contiene sitios de reconocimiento para la secuencia preS1 (21-47) del VHB. Su hallazgo sugiere que la IL-6 interviene en la interacción células VHB y podría jugar un rol determinante en el curso de la infección. La IL-6 presenta sitios de reconocimiento para la secuencia preS1 (21-47) de la proteína larga del VHB (LHBs). In vitro una interacción entre la región preS1 (12-32) de la proteína de la cubierta del VHB con la secuencia (163-171) de la IL-1 ha sido igualmente demostrada, interacción que induce aumento de la actividad de las células T ayudadoras (Kuroki et al 1990).

En resumen los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a través de los fenotipos Th1 y Th2 secretan citoquinas que activan macrófagos y linfocitos B destruyendo patógenos intracelulares como el VHB. Junto con los estudios ya realizados en ratones transgénicos otros estudios realizados en pacientes con hepatitis B aguda demuestran un predominio del patrón Th1 otras investigaciones revelan un patrón similar al fenotipo Th0. Pacientes con hepatitis B que evolucionaron a la remisión se caracterizaron por una respuesta Th2 con predominio de la IL 10 la cual actúa como potenciador de la respuesta inmunitaria humoral y supresora de la respuesta inmunitaria celular. Se considera que el comportamiento de las citocinas en hepatitis B es diferente de acuerdo con el sistema de inducción utilizado y con la condición clínico patológica del paciente. La resolución de la infección dependerá más de las peculiaridades de la respuesta inmunitaria de la persona afectada, que de la cepa viral involucrada.

## **F TRATAMIENTO**

En el caso de la hepatitis aguda, los síntomas se resuelven de uno a tres meses sin embargo algunas personas se mantienen con una fatiga prolongada, por ello el tratamiento en caso de esta condición es generalmente de soporte no obstante algunos pacientes requieren hospitalización. Por tanto el tratamiento está principalmente dirigido a la hepatitis crónica, ya que es la que a largo plazo puede tener peores consecuencias. La decisión para tratar la hepatitis B crónica se basa generalmente en una combinación de factores clínicos de laboratorio y factores histológicos.

### **F 1 Indicaciones para el Tratamiento de Pacientes con Hepatitis B crónica**

- Presencia de HBeAg y niveles de ALT superiores a dos veces el nivel normal
- Presencia de ADN VHB y niveles de ALT superiores a dos veces el nivel normal
- Moderada a severa hepatitis en biopsia de hígado
- Presencia de ADN VHB más cirrosis

Los tratamientos no son curativos porque rara vez producen remisión permanente de la enfermedad. Aun así, la meta de la terapia es la supresión a largo plazo de la replicación viral y la prevención de la enfermedad hepática grave. Los marcadores de éxito de la terapia son la seroconversión del HBeAg (producción de anti HBe), disminución de los niveles de ADN VHB y la carencia de la progresión de la enfermedad.

Las drogas aprobadas y los agentes en desarrollo para el tratamiento de la infección crónica por VHB caen en dos categorías: inmunomoduladores como el interferón alfa 2b recombinante (Intron A) y los inhibidores directos de la replicación del VHB incluyen lamivudina (Epivir) y adefovir dipivoxil (Hepsera). El protocolo de tratamiento de la AASLD recomienda pruebas de HBsAg, HBeAg y ADN VHB al inicio y al final del tratamiento y seis meses después.

## F 2 Drogas aprobadas por la FDA (Administración de Drogas y alimentos de Estados Unidos) para el tratamiento de la Infección Crónica por VHB

### **F 2 1 Interferon ALFA 2b (IFN alfa 2b) (Intrón A)**

Aprobado en los Estados Unidos como una terapia para hepatitis B crónica en 1992 se piensa que su mecanismo de acción es afectar la replicación viral y es un inmunomodulador ya que regula las citoquinas envueltas en la respuesta a infección. Algunos factores que favorecen el éxito de la terapia incluyen bajos niveles de ADN VHB, disminución de los niveles de transaminasas, ausencia de fibrosis en la biopsia hepática, sexo femenino y ausencia de coinfección con VIH. Las contraindicaciones para el uso de interferón alfa 2b incluyen la previa neutropenia, trombocitopenia, depresión incontrolada severa, cirrosis descompensada y abuso de drogas y alcohol. Debido a que el interferón alfa 2b tiene muchos efectos colaterales, la tolerancia es un problema en muchos pacientes.

En estudios de respuesta al tratamiento, el 46% de los pacientes tratados tienen seroconversión al HBeAg en los primeros 5 años después del tratamiento. Los anti HBs se desarrollan en el 8% de los pacientes tratados. A través de estudios de seguimiento después de 5 a 10 años del tratamiento, la negatividad se mantiene del HBeAg. Las tasas de respuesta y durabilidad son bajas en niños y asiáticos. El seguimiento a largo plazo de los efectos del tratamiento con IFN alfa 2b ha demostrado dos patrones de beneficio diferentes:

- Reducción en la mortalidad por HCC en pacientes asiáticos

Disminucion en la mortalidad por cirrosis descompensada en Norte América y Europa.

La duracion de la terapia recomendada en pacientes HBeAg positivos es de 16 semanas y un año en HBeAg negativos El costo de 16 semanas de tratamiento en Estados Unidos es de \$5 600 00 aproximadamente

Esta terapia no esta recomendada en menores de 1 año de edad y el paciente tratado requiere de monitoreo clinico y evaluaciones de laboratorio

## **F 2 2 Lamivudine (Eprvir)**

Es un analogo de nucleosido que fue aprobado inicialmente para el VIH y luego en 1999 se aprobó para VHB Este agente competitivamente inhibe la transcriptasa reversa, finalizando la extension de la cadena de ADN proviral Un estudio doble ciego en chinos mostro el mejoramiento histologico sustancial despues de un año de tratamiento en pacientes adultos lo cual fue prontamente seguido por un estudio en Estados Unidos que demostro la disminucion de los niveles de ADN VHB disminucion de los niveles de transaminasas y pérdida del HBeAg en pacientes adultos con hepatitis B cronica Un estudio mas reciente mostro que lamivudine tambien es efectivo en ninos con infeccion cronica por VHB

La accion de la lamivudina (2-deoxi 3 tiacitidina) esta dirigida principalmente a nivel del sitio activo de la polimerasa del VHB en el cual se localiza un locus con la secuencia de aminoácidos tirosina, metionina, aspartato aspartato (locus YMDD)

este locus permite la union del analogo de nucleósido activado para así evitar la actividad de transcriptasa reversa de la polimerasa. Las mutaciones en este locus pueden ser responsables del desarrollo de resistencia al efecto antiviral de los nucleosidos.

La lamivudina se activa mediante trifosforilación intracelular. Una vez activada inhibe la polimerasa viral y logra incorporarse a las cadenas nascentes de ADN produciendo una terminación de las cadenas. Al inhibir la HBV polimerasa también logra bloquear la activación de transcriptasa reversa necesaria para la replicación viral. Estudios aleatorios controlados han demostrado que la lamivudina produce una respuesta virológica sostenida con desaparición del ADN VHB y seroconversión de HBeAg a anti HBe en 20-30% de individuos tratados por 12 meses. El estudio histopatológico postratamiento también muestra mejoría de la actividad necroinflamatoria. Es un medicamento muy bien tolerado y libre de efectos secundarios significativos. (2) Las ventajas de lamivudine frente a IFN alfa 2b incluyen la administración oral, alto grado de tolerancia y seguridad en pacientes con cirrosis descompensada. Lamivudine puede ser usada como terapia de primera línea o seguido de la acción fallida del IFN alfa 2b. Las desventajas incluyen incertidumbre sobre la duración de la terapia y la duración de la respuesta a largo plazo. Además, las cepas resistentes a lamivudine se desarrollan en un 15-20% de los casos durante la terapia, debido a mutaciones del locus YMDD. En este caso, hay reactivación de la infección con reaparición del ADN VHB en el suero y elevación de las aminotransferasas. La duración recomendada de la terapia en HBeAg positivos es de

un año y más de un año en HBeAg negativos El costo aproximado de la terapia por mes es de \$156 00 en Estados Unidos

### **F 2 3 Adefovir dipivoxil (Hepsera)**

En el año 2000 se notó que esta droga era efectiva en la supresión de cepas de VHB que desarrollaban resistencia a lamivudine En septiembre de 2002 fue aprobado como un análogo de nucleósido para el tratamiento de la infección por VHB

Dos estudios clínicos recientes en pacientes HBeAg negativos y en HBeAg positivos demuestran un significativo mejoramiento en la histología, marcadores virológicos y bioquímicos después de 48 semanas de tratamiento no se ha observado resistencia a adefovir dipivoxil Debido a la tolerancia y ruta oral de administración es posible que reemplace al IFN-alfa 2b como terapia de primera linea en mayoría de pacientes

La duración de la terapia recomendada es de 1 año y el costo aproximado por mes es de \$528 00 Esta droga no está probada por la FDA para uso en niños

Otros medicamentos como el interferón pegalítida alfa 2a y entecavir también están aprobados para el tratamiento de personas con hepatitis B crónica Las mujeres embarazadas no deben usar estos medicamentos Tomar alcohol puede empeorar la enfermedad del hígado

## **F 2 4 Pegasys**

Es un medicamento producido por Roche un peg interferon alfa 2a (40 KDa) para el tratamiento de la hepatitis B crónica. Su uso aplica para las dos formas de cronicidad HBeAg positiva y HBeAg negativa y sus resultados se fundamentan en uno de los mayores programas de desarrollo clínico jamás realizados sobre la hepatitis B con tres estudios clínicos mundiales en los que participaron más de 1 500 pacientes.

Estos estudios pusieron de manifiesto que Pegasys era superior a los dos tratamientos de primera línea recomendados en la actualidad el interferon alfa y la lamivudina, ya que tiene un mecanismo de acción doble estimula el sistema inmunitario e inhibe la replicación viral. Su comercialización se aprobó a partir de diciembre de 2004 en Suiza.

En la hepatitis crónica, Pegasys se administra una vez por semana, en inyección subcutánea de 180g durante un periodo de 48 semanas (Roche Farma 2004).

## **F 2 5 Tratamiento con Citoquinas**

Debido a que el tratamiento combinado basado en la estimulación de la inteligencia inmune es la clave para tratar la infección crónica por el VHB se han realizado múltiples investigaciones para el estudio de diferentes citocinas en la inhibición de la replicación viral. Se ha demostrado que la interleucina 2 el factor de necrosis tumoral y el interferon alfa inhiben específicamente la expresión de la transcripción viral en el hígado. Mas aun se ha demostrado que la interleucina 12 inhibe la



replicación viral suprimiendo la transcripción viral y el nivel de postranscripción a través de la inducción de la degradación de la cápside viral por medio de la secreción del factor de necrosis tumoral alfa y del interferón gamma a nivel hepático. Estudios recientes han demostrado el efecto antiinflamatorio de la interleucina 10 evitando la posibilidad de evolución hacia fibrosis y cirrosis hepática.

## **G PREVENCIÓN / PROFILAXIS Y VACUNA CONTRA EL VHB.**

Las recomendaciones de la OMS sobre las medidas para prevenir la infección por VHB incluyen

- Protocolos de estudio de la sangre y productos hemoderivados a nivel mundial
- Destrucción de las agujas desechables y esterilización adecuada de materiales reutilizables como por ejemplo instrumentos quirúrgicos o dentales
- Tomar medidas de precaución universal y técnicas de barrera (uso de equipos esteriles uso de guantes y uso de protección ocular/facial)
- Educación acerca de los riesgos de utilizar equipos inadecuadamente esterilizados o sin esterilizar

La profilaxis usando inmunoglobulina de Hepatitis B (HBIG) comúnmente usada después del trasplante de hígado para prevenir la infección del nuevo hígado es un método efectivo en proveer temporalmente protección pasiva para la hepatitis B

En caso de que una mujer este embarazada debe hacerse una prueba de sangre para detectar la hepatitis B. A los bebés nacidos de madres infectadas con el VHB se les debe dar la HBIG y la vacuna en un periodo de 12 horas después del nacimiento.

El personal sanitario no vacunado que sufra una lesión causada por una aguja de un paciente infectado por VHB también deberá recibir HBIG e iniciar la serie de vacunación contra la hepatitis B.

#### G 1 Vacuna contra el VHB

Descrita por el CDC como la 'primera vacuna contra el Cáncer', la vacuna contra la hepatitis B previene la enfermedad de la hepatitis B y las graves consecuencias que la enfermedad genera como el cáncer de hígado. Las comunidades médicas, científicas y de salud pública favorecen firmemente el uso de la vacuna contra hepatitis B como un modo seguro y efectivo de prevenir la enfermedad y la muerte.

Una reacción alérgica seria, ya sea a la primera dosis de la vacuna contra la hepatitis B o alguno de los ingredientes de la vacuna, es una contraindicación a las dosis adicionales de la vacuna contra la hepatitis B. Las vacunas recombinantes aprobadas para su uso en los Estados Unidos son sintetizadas usando Saccharomyces cerevisiae (levadura común para cocinar) en el cual se ha insertado un plásmido que contiene el gene para el HBsAg. El HBsAg purificado se obtiene al lisis de las células de levaduras y separar el HBsAg de los componentes de levaduras por medio de técnicas bioquímicas y biofísicas. Las personas alérgicas a la levadura no deben recibir vacunas que contienen levadura.

Los datos científicos muestran que la vacuna contra la Hepatitis B es segura para bebés, niños y adultos. No existen evidencias confirmadas de que la vacuna cause enfermedad.

El protocolo habitual es una serie de tres dosis intramusculares de la vacuna, administradas durante un periodo de seis meses: vacuna inicial, repetición a los 30 días y tercera dosis a los seis meses. Este régimen induce una respuesta de anticuerpos adecuada en más de un 90% de los adultos jóvenes sanos y en más del 95% de los lactantes, niños y adolescentes (hasta los 19 años). La inmunización es uno de los medios médicamente más eficaces y con mejor relación de costo-eficacia para controlar la hepatitis vírica.

Los países que cuentan con programas de vacunación universal están siendo testigos de descensos espectaculares en el número de hepatitis crónicas por VHB y de las patologías asociadas (Abbott Científica).

Los datos actuales demuestran que los niveles de anti HBs pueden disminuir con el paso del tiempo. Sin embargo, la memoria inmune (respuesta anti HBs anamnesica) permanece intacta en forma permanente después de la vacunación, de manera que las personas con niveles de anticuerpos disminuidos todavía están protegidos contra la enfermedad clínica y la enfermedad crónica. La respuesta inmune frente al VHB posterior a la vacuna tiene un importante factor individual, por lo que se recomienda determinar la presencia de anti HBs postvacunación en determinados grupos.

Se recomienda realizar anti HBs en

- Personal de Salud

- Recien nacidos de madres infectadas con VHB
- Parejas sexuales de personas con infeccion cronica por VHB
- Individuos inmunodeprimidos

A nivel internacional algunos paises recomiendan determinar los niveles cuantitativos de anti HBs con el fin de

- Seleccionar individuos para determinar la necesidad de vacunacion inicial
- Establecer el nivel inicial de anti HBs de un individuo despues de la serie de vacunacion
- Determinar si la revacunacion es necesaria debida a una respuesta inadecuada a la serie inicial de vacunacion
- Valorar la recuperacion de la infeccion por VHB
- Valorar la respuesta positiva al tratamiento

La salud de un individuo en el momento de la vacunacion afecta su respuesta a la vacuna e influye sobre la aparicion y duracion de la inmunidad. Los factores que influyen negativamente sobre la capacidad de un individuo para hacerse inmune frente a la hepatitis B como resultado de la vacunacion influyen

- Edad avanzada
- Obesidad / tamano corporal
- Tabaquismo
- El 40-50% de los pacientes severamente inmunodeprimidos no responde a la vacuna (ej. pacientes en diálisis)

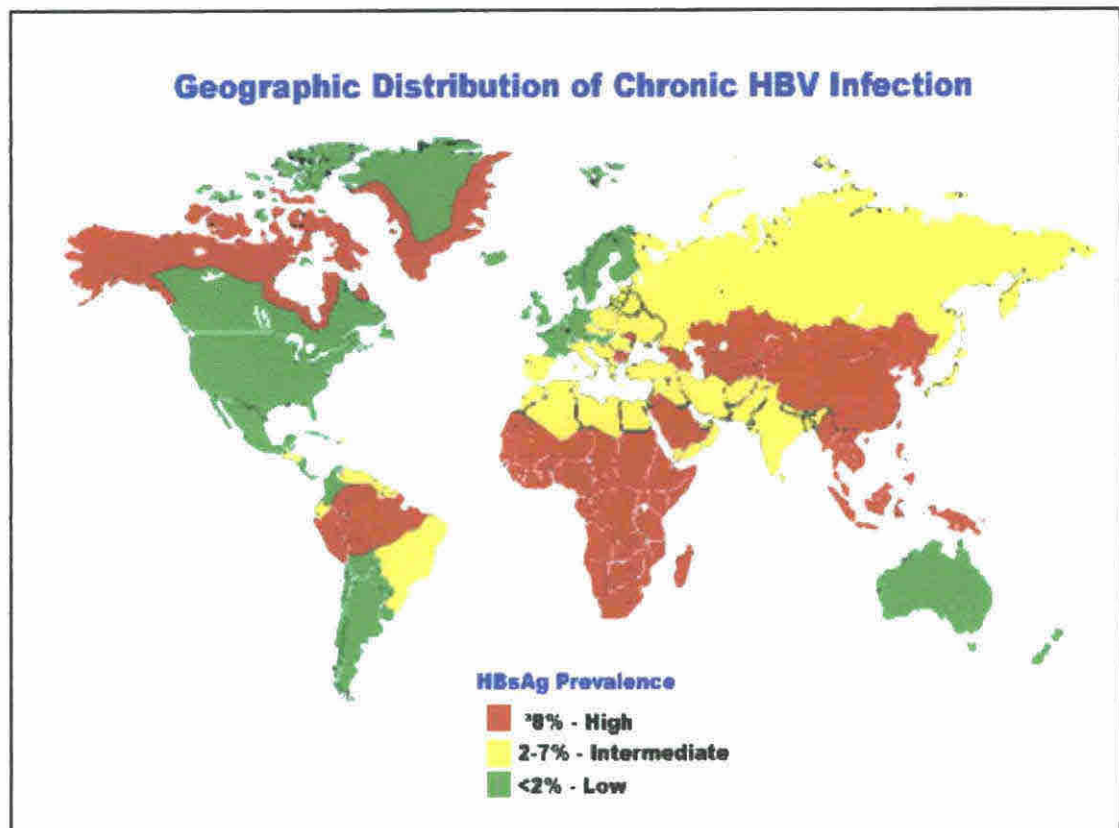
## **H. EPIDEMIOLOGIA**

La hepatitis B es un serio problema de salud pública, mas de 300 millones de personas son portadores del virus de hepatitis B y segun datos de la OMS representa la novena causa de muerte en el mundo El VHB es responsable de 40% de los casos de hepatitis agudas en nuestro medio y la infeccion cronica causa del 5 10% de los casos de enfermedad hepatica cronica (CLD) y cirrosis en los paises occidentales Por otra parte es una indicacion relativamente frecuente de trasplante hepatico

Alrededor del mundo la prevalencia de positividad por HBsAg en paises va desde 0% hasta tasas que exceden el 20% (Ver Fig 12)

La infeccion por VHB en paises industrializados ocurre predominantemente en adultos donde el curso clinico se ve mas frecuentemente en infeccion aguda

En paises de menos recursos ocurren frecuentemente infecciones cronicas llevando a una alta tasa de prevalencia de infeccion por hepatitis B en tales areas Un alto numero de niños y jovenes estan infectados de los cuales el 90% de los niños son infectados desde su nacimiento y 30% de los niños por debajo de 5 años no pueden 'clarificar' el virus completamente y continuan cronicamente infectados por el resto de sus vidas Panama se encuentra en la lista del CDC como pais de America con prevalencia  $\geq 2.0\%$  junto con Belice Guatemala y Honduras (CDC Home Page)



**Figura 12:** Muestra la distribución geográfica de la infección crónica por VHB a nivel mundial, según la prevalencia de HBsAg. Datos de la OMS hasta 1996. <http://www.cdc.gov>

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y METODOS**

A continuacion se describiran en orden alfabético los materiales y reactivos y la metodologia utilizada para la realizacion de este proyecto

#### **A Material necesario para captacion del Donante y para Toma y Envio de Muestra**

- 1 Crioviales para la separacion de suero anti HBcore positivo
- 2 Formulario de Recoleccion de Datos (Ver Anexo)
- 3 Gradillas
- 4 Guantes de latex
- 5 Hielera.
- 6 Hoja de Consentimiento Informado (Ver Anexo No 6)
- 7 Pads congelados
- 8 Tubo Plastico para 5ml con EDTA, tipo Vacutainer marca Becton & Dickinson

#### **B Material necesario para el Procesamiento de las Muestras Anti HBcore Positivas**

##### **B 1 Fase Serológica**

###### **B 1 1 Materiales**

- 1 Bandeja para descarte
- 2 Copas desechables para servir suero en equipo Vitros Eci (marca Ortho Clinical Diagnostics)
- 3 Gradilla
- 4 Guantes de latex.
- 5 Hoja para reportar resultados

- 6 Puntas desechables para aspirar el suero en equipo Vitros Eci (marca Ortho Clinical Diagnostics)
- 7 Reactivos para equipo Vitros Eci (Ver Tabla No 2)

#### **B 1 2 Equipos de la Fase Serológica**

- 1 Centrifuga para separacion de suero
- 2 Equipo de Quimioluminiscencia Vitros Eci de Jhonson & Jhonson

#### **B.2 Fase Molecular**

A continuacion se listan en orden alfabetico todos los materiales y reactivos que son necesarios para la Extraccion de ADN de suero Amplificación para PCR y NESTED PCR, y para la medición de la carga viral en el Equipo Cobas Amplicor

#### **B 2 1 Reactivos**

- 1 Agarosa
- 2 Agua destilada
- 3 Agua libre de nucleasas
- 4 Alcohol al 95%
- 5 Bromuro de Etidio 95%
- 6 ADN off (limpieza de las areas)
- 7 Etanol 70%
- 8 Hipoclorito
- 9 Isopropanol 90%
- 10 Go Taq Green Master Mix de Promega \*
- 11 Primers o cebadores \*\*



12 Primers GAPDH

13 Proteinasa K 10 mg/dl

14 Kit de COBAS AMPLICOR HBV MONITOR Test de 48 determinaciones

P/N 03610110 190 que contiene

- Reactivos para preparacion de las muestras
- Reactivos de Control
- Reactivos de Amplificacion
- Reactivos Especificos de Deteccion

15 Kit de Extraccion de ADN Gentra Systems Blood Kit Part No D 5500 que

contiene

- Solucion de Hidratacion de ADN
- Solucion de Precipitacion de Proteinas
- 1 Solucion de Lisis de Celulas
- 2 Solución de Lisis de Glóbulos Rojos

16 Tampon TBE 10 X y 0 5X (Tris/ Acido Bórico/ EDTA)

### B 2 3 Materiales

- 1 Bolsa sellable
- 2 Buffer de carga (Loading buffer)
- 3 Cajas de congelacion
- 4 Contenedor para hielo de boca ancha.
- 5 Cuviales de 0 5 ml
- 6 Cuviales de 1 5 ml
- 7 Erlenmeyer

- 8 Flotadores para crio viales
- 9 Gasas
- 10 Gradillas para crio viales de 1.5 ml
- 11 Guante contra calor
- 12 Guantes de latex desechables libres de polvo
- 13 Kimwipes
- 14 Marcador Permanente
- 15 Marcador de Peso Molecular de 100 pb Qbiogene
- 16 Micropipetas Thermo Labsystems ajustables de 20-200  $\mu$ l de 1-10  $\mu$ l y de 100-1000  $\mu$ l
- 17 Papel Parafilm
- 18 Papel Toalla
- 19 Peines
- 20 Probeta graduada de 100 ml
- 21 Pipetas de transferencia con punta fina, esteriles
- 22 Puntillas con filtro de 20-200  $\mu$ l 1000  $\mu$ l 1-10  $\mu$ l
- 23 Tijeras
- 24 Tubos tipo Sarstedt con tapa de rosca para 1.5 ml

\* GoTaq ® Master mix es una mezcla de buffer dNTPs  $MgCl_2$  y Taq Polimerasa

\*\*La secuencia de primers se describirá mas adelante

#### B 2.4 Equipos

- 1 Analizador COBAS AMPLICOR.
- 2 Agitador Vortex.

- 3 Balanza Analítica
- 4 Bano Maria de 37 C
- 5 Camara de Electroforesis Horizontal Owl modelos B1 y B3 Ver Anexos
- 6 Cámara o cabina para Extraccion de ADN con luz ultravioleta
- 7 Camara de Flujo Laminar NUAIRE clase II Tipo A/B3
- 8 Computadora con Software AMPLILINK
- 9 Congelador a -20 C
- 10 Destilador de agua
- 11 Impresora
- 12 Fuente de Poder E C modelo EC 105
- 13 Maquina de hacer hielo
- 14 Microcentrifuga de alta velocidad modelo Micromax, Termo IEC
- 15 Microondas General Electric
- 16 Refrigeradora de 2 8°C
- 17 Reloj
- 18 Sistema Fotodocumentador UVP modelo M 20
- 19 Termobloque
- 20 Termociclador Gene Amp PCR System 2700 y Techne de Flexigene modelo

FFG02HSD

### **C Preparación de Soluciones**

#### **C 1 Tampon TBE 0.5X**

TBE 10X	50ml
Agua destilada	950ml

**C 2 Gel de Agarosa 2%**

Agarosa	1 gramo
---------	---------

TBE 0 5X	50 ml
----------	-------

**D Metodologia**

A continuacion se describira la metodologia que se siguio en cada fase del estudio

Tipo de Estudio Estudio Descriptivo

**D 1 Fase de Muestreo****D 1 1 Universo De Estudio**

Donantes de 6 bancos de sangre de la Republica de Panama

El criterio de seleccion de los Bancos de Sangre fue escoger aquellos que manejan un elevado numero de donantes en el pais y por tanto la mayoria de unidades anti HBc positivas a excepcion del Banco de Sangre de Changuinola Este se eligio debido a la elevada seroprevalencia del marcador anti HBc en las unidades de sangre donadas

**D 1 2 Calculo de la muestra**

Se realizo en base al numero total aproximado de donantes recibidos anuales

$N$  = población aproximada anual de donantes = 45 000

$n$  = muestra, subconjunto de la población  $N$

$V^2$ = varianza de la poblacion Su definición  $(Se)$  cuadrado del error estandar

$S^2$ = varianza de la muestra expresada como la probabilidad de ocurrencia de y

$Se$ = error estandar =0 015

Calculo del tamaño provisional de la muestra

$$n = S^2 / V^2 S^2 = p (1 - p) = 0.9(1 - 0.9) = 0.09$$

$$V^2 = (0.015)^2 = 0.000225n = 0.09/0.000225 = 400$$

$$n = \frac{n}{1 + n/N} = \frac{400}{1 + 400/45\,000} = 396$$

Este es el procedimiento para obtener una muestra probabilística determinar su tamaño con base a una población estimada (Sampieri R. et al 2000)

### **D 1 3 Procedencia de la Muestra**

Se incluirían en el estudio 400 donantes que aceptaran la participación distribuidos así 150 donantes en el año 2005 50 del Banco de Sangre del Hospital Rafael Hernández, 50 del Hospital José Domingo de Obaldía y 50 del Hospital de Changuinola. En el año 2006 50 del Hospital Manuel Amador Guerrero en Colón y 100 del Hospital Santo Tomás y en el año 2007 100 donantes del CHMAAM.

### **D 1 4 Recolección De Datos**

A los donantes que pasaban el filtro del médico del Banco de Sangre se les preguntaba si deseaban participar en un estudio con una breve explicación del mismo Si el donante aceptaba, entonces firmaba el consentimiento informado (Ver Anexo 6) y al finalizar la donación llenaban el Formulario de Recolección de Datos Ver Anexo 7

Para la tabulación de los datos obtenidos se utilizó el programa Excell

### **D 1 5 Toma de Muestra.**

A todos los donantes incluidos en el estudio aparte de los tubos que son tomados para la donación regular se les tomó una muestra de sangre anticoagulada con EDTA, con el objeto de mantener plasma de reserva. Las muestras de suero de los anti HBc+ que se colectaron en los Bancos de Sangre se conservaron en el ICGES LCRSP en congelación a 20°C hasta la determinación de los marcadores serológicos

### **D 1 6 Criterios de Inclusión**

Muestras anti HBc+ de donantes captados en los 6 Bancos de Sangre elegidos para el estudio en el periodo comprendido desde julio de 2005 hasta mayo de 2007

### **D 1 7 Criterios de Exclusion**

- Muestras que lleguen sin refrigeracion
- Muestras hemolizadas
- Muestras contaminadas
- Muestras que lleguen sin el formulario de recoleccion de datos completo

## **D 2 Fase Serológica**

### **D 2 1 Pruebas Serologicas**

Inicialmente se realiza la confirmacion de anti HBc y HBsAg por medio de la tecnica de Quimioluminiscencia Amplificada (Ver Fig 9 Pag 45)

Se determinaran marcadores serológicos no tradicionales como el HBeAg anti HBs y anti HBe a todas las muestras anti HBc positivas por el metodo de quimioluminiscencia amplificada en el equipo Vitros Eci (Ver Anexo No 4)

Debido a que el ICGES LCRSP se encarga de la confirmacion de las muestras anti HBc positivas de los bancos de sangre en el Banco de Sangre se separo una cantidad de suero anti HBc positivo para este estudio la cual fue enviada al ICGES LCRSP como se hace usualmente

En este punto necesitábamos como mínimo 250 ul de muestra, que es la cantidad que absorbe el equipo para analizar todos los parametros (anti HBe HBeAg anti HBs anti HBc y HBsAg) sin embargo la copita debe estar por lo menos con 400 ul para que la sonda de aspiracion no tenga problema de formacion de burbujas al aspirar

Antes de utilizar el equipo Vitros Eci se deben calibrar los parámetros y almacenar los datos de los lotes de los reactivos utilizando las tarjetas magnéticas que vienen en cada caja de reactivo y calibrador

El equipo no permite la corrida de muestras mientras se realiza la calibración, ésta demora aproximadamente 1 hora por parámetro y se pueden calibrar varios parámetros a la vez

Una vez finalizada la calibración se procede a programar las muestras y los controles

El equipo automatizado permite la medición de todos los parámetros tomando la muestra de una sola copa. Este equipo evita la contaminación cambiando las puntillas entre cada copa de muestra aspirada en otros equipos la sonda se lava entre cada muestra, sin embargo se mantiene el riesgo de contaminación

Las muestras y controles se programan a través del teclado y se ubican en carruseles que tienen una capacidad de hasta 10 copas

El equipo envia mensajes segun la condición de la muestra es decir si hay burbujas si tiene coágulo o si hay poca cantidad

En aproximadamente 55 minutos se obtienen los resultados

A continuación se puede descartar o bien 'rescatar' el resto del volumen de suero que no fue absorbido

La interpretación del resultado de cada parámetro es diferente y el equipo lo proporciona directamente El cálculo de los resultados de cada parámetro se muestra con más detalle en la Tabla 3 en el Anexo No 8

### **D 3 Fase Molecular**

#### **D 3 1 Extraccion de ADN**

Para este paso se utilizo el kit de extraccion de Gentra Systems Puregene® DNA Purification Kit Part. No D 5500

El procesamiento de una muestra de suero para extraccion de ADN incluye los siguientes pasos

- Lisis de células
- Precipitación de Proteínas
- Precipitación de ADN
- Hidratación de ADN

Antes de iniciar el procedimiento de extraccion de ADN se debe asegurar la limpieza del area limpiando la mesa de trabajo con alcohol al 95% preferiblemente debe existir un area destinada a este fin si no existe se puede trabajar en una cámara de flujo laminar

Debemos buscar todos los insumos necesarios y tenerlos a la mano al igual que dentro del area de extraccion debe haber vortex, microcentrifuga y un envase para descarte

La extraccion de ADN se realizo a partir de 100 ul de suero y la cantidad de ADN producido es aproximadamente de 0.25 ug de ADN

#### **D 3 2 Lisis de Células**

- 1 Añadir 100 ul de suero en un criovial esteril de 1.5 ml y debidamente rotulado que contenga 500 ul de Solucion de Lisis de Células Pipetee varias veces para mezclar
- 2 Para lograr una mayor produccion se anade 6 ul de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incuban los tubos a 37 °C toda la noche en un baño maria \*\*



**\*\*Esta parte del procedimiento se modificó obteniéndose mejores resultados El protocolo comercial decia que habia que incubar a 65° por 15 minutos o a 55° por 1 hora.**

#### **D 3 3 Precipitacion de Proteinas**

- 1 Se dejan enfriar los crioviales a temperatura ambiente
- 2 Añadir 200 ul de Solucion de Precipitacion de Proteinas al lisado
- 3 Se da vortex a alta velocidad por 20 segundos para que la solucion de Precipitacion de Proteinas se mezcle uniformemente con el lisado
- 4 Se colocan los crioviales en baño de hielo por 5 15 minutos
- 5 Se centrifuga a 13 000 –16 000 x g por 3 minutos Las proteinas precipitadas forman un boton compacto

#### **D 3 4 Precipitacion del ADN**

- 1 Se pasa el sobrenadante que contiene el ADN (dejando atras el botón precipitado) a un criovial limpio de 1.5 ml debidamente rotulado que contenga 600 ul de Isopropanol 100%
- 2 Se mezcla unas 50 veces por inversion y se lleva el tubo a temperatura ambiente por 5 minutos
- 3 Se centrifuga a 13 000 16 000 x g por 5 minutos El ADN puede o no estar visible como un pequeño boton blanco dependiendo de su produccion
- 4 Se retira el sobrenadante y se invierte el tubo brevemente sobre papel absorbente Luego se añade 600 ul de Etanol 70% y se invierte el tubo varias veces para lavar el boton de ADN
- 5 Se centrifuga a 13 000 16 000 x g por 1 minuto Cuidadosamente se retira el etanol

- 6 Se invierte el tubo y se deja secar sobre papel absorbente o gasa y se permite que el aire seque el tubo por 10 15 minutos

#### **D 3 5 Hidratacion del ADN**

- 1 Se añade 20 ul de Solucion de Hidratacion de ADN (con 20 ul se obtiene una concentracion de 100 ng/ul si la produccion es de 2 ug de ADN)
- 2 Se rehidrata incubando el crivial a 65°C por 5 minutos \*\* (Se modifiko)
- 3 Se almacenan los tubos a 4 C si se van a utilizar inmediatamente o al dia siguiente o se congelan a -20°C si es para uso posterior

#### **D 3 6 Amplificación del ADN**

##### **D 3 6 1 Verificacion de la Presencia de ADN utilizando un Housekeeping gene**

Luego de obtenido el ADN se procedera a su amplificación

Inicialmente se tomaron muestras de ADN extraido al azar las cuales se amplificaron con cebadores especificos del gen humano de la GAPDH Estos cebadores de genes reporteros se utilizan para verificar la calidad de extraccion

La secuencia de los primers es

GAPDH 1 5' GGG GAG CGA GAT CCC TCC AAA ATC AAG TGG GG 3'

GAPDH 2 5' GGG TCA TGA GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT TG 3'

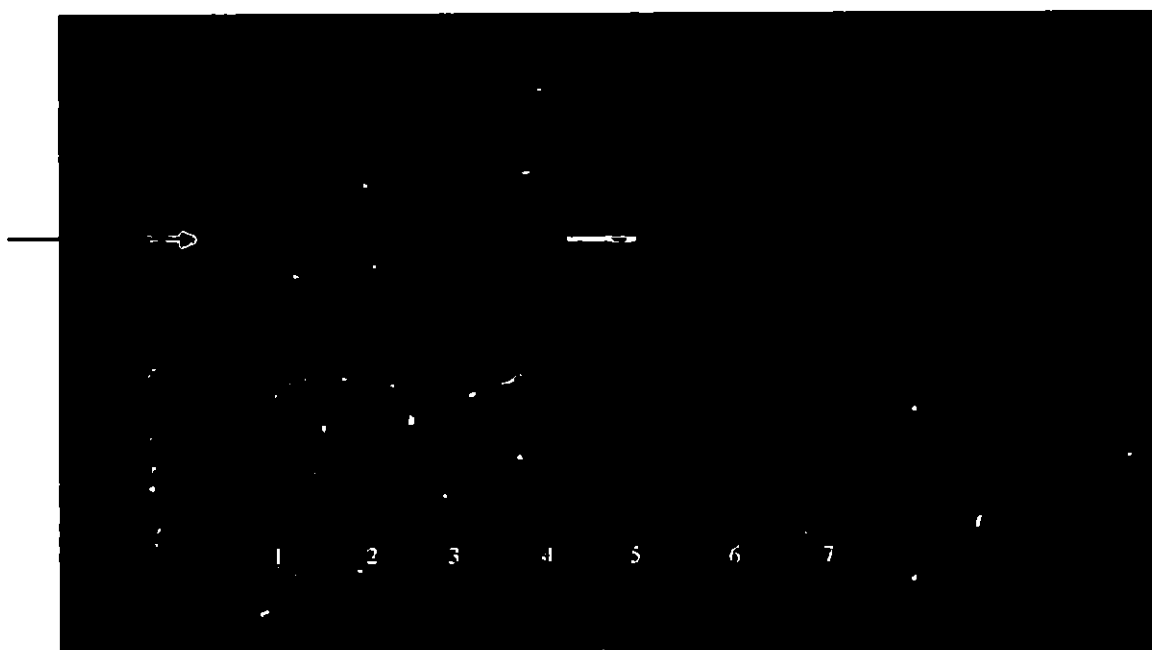
La mezcla de reaccion es

Green Master Mix	12.5 ul
Agua	5.5 ul
Primer 1	2.0 ul
Primer 2	2.0 ul

Los tiempos y temperaturas de amplificación son los siguientes

94 C x 5 min	→	precalentamiento	} 35 Ciclos
94 C x 1 min	→	desnaturalización	
52 C x 1 min	→	anidamiento	
72 C x 1 min	→	extensión	
72 C X10 min	→	extensión final	

Los resultados de esta amplificación se muestran en la Fotografía No 1



**Foto No 1** De izquierda a derecha se puede observar la banda que se obtiene (indicada por la flecha) de la amplificación con GAPDH, en 6 muestras tomadas al azar nótese en la sexta y séptima posición la ausencia de esta banda, en la sexta no hubo amplificación por lo que se deduce que no hubo extracción de ADN y la última es un control negativo

Una vez comprobada la presencia de ADN mediante el procedimiento anterior hay que reconstituir los primers que se usarán para PCR y Nested PCR, los cuales vienen deshidratados

La reaccion de amplificacion se efectua con un primer par de primers diseñados para amplificar fragmentos altamente conservados de la region S que codifica el gen del antígeno de superficie y un segundo par de primers que codifica el gen de la cápside del VHB (Lanford RE 1998 Zaijier HL 1994)

Se reconstituyen de manera que queden a una concentracion 100 umol

La proporcion la da la concentración en nmol de cada primer (p e 22 5nmol (100) =225 umol) este sera el stock de cada primer Esta dilucion de los primers se debe llevar a cabo en una cámara de flujo laminar y con puntas con filtro ya que es necesario evitar al maximo la contaminacion de los primers

De este stock, se preparan alicuotas que queden a 10 pmol

Las Secuencias de los primers utilizados son las siguientes

#### 1a ronda (PCR)

HBVF1 (1735 1759) (5 ) TTC AAG CCT CCA AGC TGT GCC TTG G (3 ) Sentido

HBVF2 (2274 2294) (5 ) TCT GCG ACG CGG CGA TTG AGA (3 ) Antisentido

Tamaño del fragmento esperado **560 pb**

(Zaijier y col 1994 Lanford y col 1998) (Liang T 1989)

#### 2a ronda (Nested)

HBVF3 (1884 1904) (5 ) CCT TGG GTG GCT TTG GGG CA (3 ) Sentido

HBVF4 (2274 2295) (5 ) AGG ATA GGG GCAT TTG GTG GTC TAT A (3 )  
Antisentido

(Zaijier y col 1994 Lanford y col 1998)

Tamaño del fragmento esperado **411 pb**

Una vez se tienen los primers alicuotados se procede a preparar la mezcla de reacción para PCR.

### Mezcla de Reacción para PCR

Master Mix	12.5 ul
H <sub>2</sub> O	5.5 ul
Primer F1	2 ul
Primer F2	2 ul

El volumen final en cada tubito debe ser de 25ul de manera que se toman 3 ul del ADN extraído para completar la mezcla de reacción

Una vez finalizada la mezcla de reacción se procede a llevar el tubito al Termociclador el cual previamente se le ha programado el protocolo de amplificación para la PCR.

### D 3 6 2 Protocolo de Amplificación para PCR y Nested PCR.

El protocolo de amplificación se siguió en base a otro previamente estandarizado por la Dra. Cristina Gutierrez, del IVIC en un estudio en donde se comparó la detección de ADN del VHB por PCR, mediante la utilización de diversos conjuntos de primers

El proceso de amplificación dura aproximadamente 3 horas Ver Tabla 3

Ciclos	Temp.	Tiempo
1 CICLO	95	4 min
	55	1 min
	72	1.5 min
5 CICLOS	95	1 min
	55	1 min
	72	1.5 min
35 CICLOS	90	1 min
	55	1 min
	72	1.5 min
Extensión Final 72 4 min		

**Cuadro No 1** Describe el protocolo de amplificación de la PCR.

Para la PCR anidada, el producto de esta amplificación se diluye 1/100 tomando 1 ul del producto amplificado con 99 ul de agua libre de nucleasas en un tubito de 0.5 ml limpio y debidamente rotulado. La sensibilidad de la PCR anidada es de 10 copias de ADN de VHB/ ml de plasma.

### **Mezcla de Reacción para la Nested PCR**

Se prepara una nueva mezcla de reacción ahora con los primers F3 y F4

Master Mix	12.5 ul
H <sub>2</sub> O	5.5 ul
Primer F3	2 ul
Primer F4	2 ul

Se toman 3 ul del producto de PCR diluido y se lleva a 25 ul de volumen final con 22 ul de la mezcla de reacción.

El Protocolo de amplificación de la PCR anidada es el siguiente

Ciclos	Temp. °C	Tiempo
1 CICLO	95°	4 min
	55	1.25 min
	72°	1.5 min
5 CICLOS	95°	1 min
	55	1 min
	72	1.5 min
25 CICLOS	90°	1 min
	55	1.25 min
	72°	1.5 min
Extension Final 72 5 min		

**Cuadro No.2** Describe el protocolo de amplificación de la Nested PCR

Se hizo una corrida en gel de Agarosa al 2% para verificar el tamaño del fragmento esperado

### **D 3 7 Detección de los Productos Amplificados**

Al concluir el tiempo necesario para que ocurra completamente la PCR se procedera a la deteccion de los productos amplificados mediante una electroforesis en gel de Agarosa al 2%

#### **D 3 7 1 Electroforesis en Gel de Agarosa**

- Preparación del gel de agarosa
  - 1 Pesar 2g de Agarosa
  - 2 Tomar un Erlenmeyer y agregar en él 100 ml de tampon TBE 0.5X.
  - 3 Se agrega la agarosa en el erlenmeyer y se disuelve colocandolo en el microondas se calienta por 30 segundos y luego se saca con cuidado utilizando el guante protector contra calor se revuelve y se coloca por 20 segundos más al retirarlo se debe observar la mezcla transparente y libre de burbujas
  - 4 Se deja refrescar hasta que se soporte el contacto con la piel (aprox 50-60°C) y luego se agregan 10 ul de Bromuro de Etidio se mezcla bien y se tapa con un papel de aluminio para evitar el escape de los vapores

#### **D 3 7 2 Armado de la Camara de Electroforesis**

Para formar el gel primero se debe armar el molde colocando éste en el centro de la cámara en la posición que cierra el molde con las paredes de la camara

- 1 Se ajusta el peine en la ranura del molde destinada para este fin
- 2 Se añade la mezcla de agarosa dentro del molde preparado
- 3 Se deja polimerizar la agarosa completamente

- 4 Una vez finalizada la polimerización se retira el peine y el molde se coloca en posición para la corrida electroforética

#### **D 3 7 3 Colocación de las muestras en el gel de agarosa y electroforesis**

- 1 Antes de colocar las muestras en el gel se deben anotar las posiciones que ocuparan las muestras controles y marcador de peso molecular en el gel

Al colocar los productos de amplificación de cada muestra en el gel se coloca primero el producto de PCR e inmediatamente el producto amplificado de la Nested de la misma muestra

- 2 Se llena la cámara con tampón TBE 0.5X, hasta cubrir el gel
- 3 Se toman 10 µl de los productos amplificados de la Nested PCR y se carga en el pozo respectivo sin producir burbujas y sin sobrepasarlo usando una micropipeta ajustable
- 4 Se conectan los cables de la cámara de electroforesis a una fuente de poder de manera que el polo negativo quede en la dirección de los pocillos
- 5 Se ajusta el voltaje de la fuente de poder a 90 voltios
- 6 La corrida se detiene cuando el frente de color se encuentra de 1.2 cm del final del gel
- 7 Al finalizar la corrida, se apaga la fuente de poder y se toma el gel con guantes y se lleva al sistema fotodocumentador
- 8 Se registra la corrida electroforética fotografiando el gel y guardando la imagen en un disco

#### **D 3 8 Análisis Cuantitativo de las Muestras Positivas por PCR y Nested PCR mediante la prueba Cobas Amplicor HBV Monitor**



Una vez conocidos los resultados de la amplificación por PCR y Nested PCR, se procede a realizar la cuantificación del ADN del VHB utilizando el kit de COBAS AMPLICOR HBV MONITOR. La sensibilidad de este método es de 60 UI/ml o 300 copias de ADN de VHB

Pasos necesarios para la cuantificación se deben seguir estrictamente las indicaciones del inserto

Inicialmente las muestras a analizar deben haberse mantenido congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta por 6 semanas

1 La cuantificación conlleva tres pasos

- Preparación de los reactivos
- Preparación de las muestras y controles
- Amplificación

3 La preparación de los reactivos se debe realizar en el área de pre amplificación (puede ser en una cabina sin flujo laminar pero debe tener luz ultravioleta y luz blanca)

4 Primero se limpia toda el área con una gasa o papel toalla húmeda con lejía, incluyendo los soportes para los anillos A y las micropipetas

5 Anillos soporte de los anillos micropipetas gradilla y tubos tipo Sarstedt deben permanecer dentro de la cabina y se exponen a la luz ultravioleta por 15 minutos

6 En estos 15 minutos se colocan los reactivos de extracción de ADN (HBM LYS 1 HBM LYS 2 Y HBM LYS 3 NHP) HBM QS y controles del kit, dentro de otra cabina con flujo laminar que debe estar limpia y que se usará para el paso de

**Preparación de las muestras y controles** Las muestras se deben colocar a temperatura ambiente dentro de la cámara pero alejadas de los reactivos y controles

Dentro de esta cámara debe haber un vortex y si es posible una microcentrífuga, también un envase para descarte con lejía.

También se enciende el termobloque a 60°C

- 7 Luego de este tiempo se comienza el proceso de preparación de los reactivos siguiendo paso a paso el inserto inicialmente se prepara la mezcla maestra con  $Mg^{2+}$  y el HBM MMX, y se colocan 50 µl de la mezcla en los 12 tubitos del anillo A.
- 8 El anillo A se guarda en una bolsa plástica sellada y conserva a 2-8°C no más allá de 4 horas
- 9 La preparación de las muestras y controles se realiza en el área de preamplificación en la cámara con flujo laminar
- 10 Todos los reactivos y controles se les mezcla con el vortex por 5-10 segundos antes de su uso
- 11 Se identifican los tubos tipo Sarstedt de 1.5 ml que se usaran para controles y muestras y se les coloca una guía para que al centrifugar se sepa de qué lado está el botón
- 12 Se añaden 50 µl de HBM LYS 1 a todos los tubos incluyendo controles
- 13 Se añaden 100 µl del NHP (plasma humano negativo) a los tubos de controles y se mezclan por vortex
- 14 Se añaden 100 µl de las muestras a los tubos rotulados de muestras y se mezclan por vortex por 5-10 seg

- 15 Con la marca de guía hacia fuera de la centrifuga, se colocan los tubos y se centrifugan a la máxima velocidad (12 500 16 000 g) por 5 minutos
- 16 Con la pipeta de transferencia se descarta el sobrenadante cuidando de no tocar el botón
- 17 Se añaden 25 ul de los controles negativo positivo bajo y positivo alto a los tubos rotulados para controles
- 18 Se prepara el reactivo 2 de lisis de trabajo añadiendo 50 ul del HBM QS a un tubo de HBM LYS 2 se mezcla bien con vortex y se añaden 100 ul de la mezcla a todos los tubos y se mezclan nuevamente por vortex intentando disolver el botón, no es necesario disolverlo totalmente
- 19 Se incuban los tubos a 60°C por 1 hora
- 20 Luego de este tiempo se añaden 100 ul de HBM LYS 3 a cada tubo y se mezclan por vortex y se incuban a 100°C por 10 minutos
- 21 Después de este tiempo se centrifugan todos los tubos por 15 min a 12 500 16 000 g a temperatura ambiente
- 22 Se saca el anillo A de la refrigeradora y se le añade 50 ul de las muestras y controles procesados a cada tubito que contiene la mezcla maestra
- 23 Se tapan los tubitos y se identifican las posiciones en un mapa con el diagrama del anillo
- 24 En el área de post amplificación en donde se encuentra el analizador COBAS AMPLICOR (Ver Anexo No 5) previamente se debe haber hecho el mantenimiento diario y se carga el equipo con los reactivos específicos en su respectivo espacio y los reactivos genericos que también son necesarios para la detección

- 25 Se programan las posiciones del anillo de las muestras y controles y se introduce el numero de UI especifico del lote del estándar de cuantificación del HBV y los rangos de control positivo bajo y alto que se proporcionan en la tarjeta de datos que viene en el kit.
- 26 El analizador realiza automaticamente las tareas de amplificación dilución del amplicón y detección
- 27 Los resultados se expresan en UI de ADN del VHB por ml (UI/ml)

#### **D 3 8 1 Cálculo de los Resultados del Análisis Cuantitativo de ADN de VHB**

Para cada muestra y control el analizador COBAS AMPLICOR determina automáticamente el título de ADN del VHB de la siguiente manera

- Selecciona todas las diluciones del amplicón del estándar de cuantificación QS y del amplicón objetivo que se encuentren dentro del rango de absorbancia lineal del ensayo ( $A_{660}$  0.15-2.0). Al menos una dilución del amplicón objetivo y una dilución del amplicón del QS tienen que encontrarse dentro del rango lineal para calcular el resultado
- El analizador determina si el valor de  $A_{660}$  para HBM QS es aceptable confirmando que los pasos de procesamiento amplificación y detección de las muestras se realizaron correctamente
- Determina que las diluciones de los controles obtengan valores de  $A_{660}$  dentro de los rangos establecidos para que el ensayo sea válido
- Genera una impresión de los valores de  $A_{660}$  de todas las diluciones del amplicón del VHB y del estándar de cuantificación y el número de UI/ml calculadas para

cada muestra y control. El número de copias se muestra en notación científica debajo de la identificación de la muestra en el impreso de los resultados.

La obtención de resultados fiables depende de una adecuada obtención de las muestras y del uso de los procedimientos adecuados de transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras. Además de tomarse en consideración que el uso de este producto debe limitarse a personal que haya recibido capacitación en la técnica de PCR.

## Capítulo III

### Resultados y Discusión

#### A. Fase de Muestreo

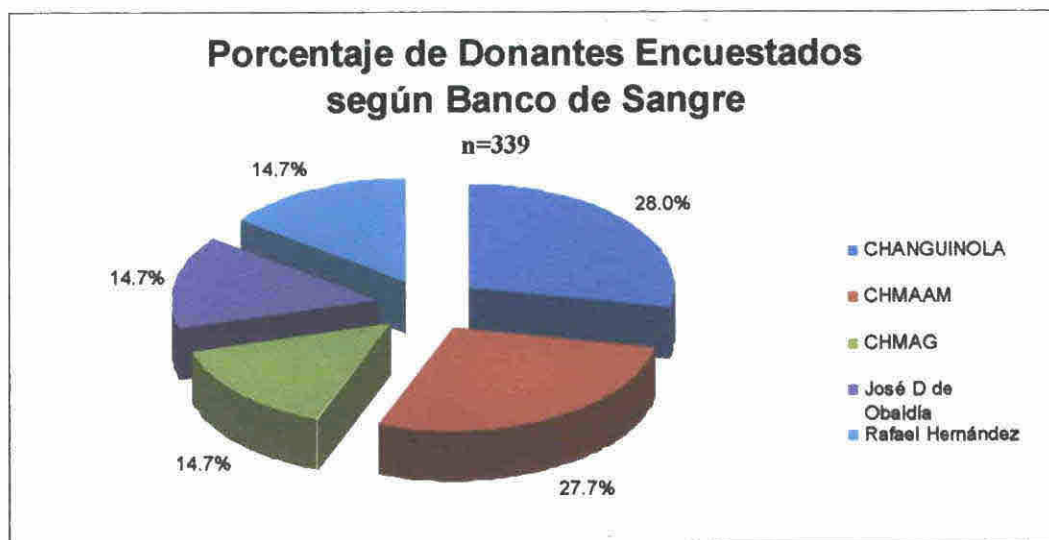
##### A.1 Procedencia de la Muestra

El universo de estudio lo conforman donantes que aceptaban participar en el estudio en los Bancos de Sangre seleccionados firmaban el Consentimiento Informado y llenaban voluntariamente el Formulario de Recolección de Datos. Se incluyeron 339 donantes (85% de la muestra calculada)\* de cinco Bancos de Sangre de cuatro provincias del país. Ver Tabla 6 y Gráfico 2. Las encuestas y muestras de los donantes del Banco de Sangre del Hospital Santo Tomás fueron excluidas del estudio porque los formularios que llegaron estaban incompletos y muchos se perdieron, por consiguiente se aplicó uno de los criterios de exclusión.

**Tabla 6 Número y Porcentaje de donantes Participantes, según Banco de Sangre.**

<u>Banco de Sangre</u>	<u>Provincia</u>	<u>No. Donantes Participantes y Porcentaje</u>
Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía	Chiriquí	50 (14.7%)
Hospital Regional Rafael Hernández	Chiriquí	50 (14.7%)
Hospital de Changuinola	Bocas del Toro	95 (28%)
Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid	Panamá	94 (27.7%)
Complejo Hospitalario Dr. Manuel Amador Guerrero	Colón	50 (14.7%)
Hospital Santo Tomás	Panamá	0 (0%)
Total		339 (100%)*

Gráfico 2.



### B. Información Epidemiológica:

La información obtenida a través del “Formulario de Recolección de Datos” de los 339 donantes que participaron del estudio, se muestra en detalle en los Anexos No. 13-16.

A continuación se presenta el análisis de cada una de las variables incluidas en el mismo.

- a. Edad: la edad de los donantes osciló entre los 18 y 64 años; en ambos sexos la mayor frecuencia estuvo en el rango de 25-38 años. Ver Tabla 7 y gráficos 3 y 4.

**Tabla 7. Número y Porcentaje de Donantes Encuestados,  
Según Rango de Edad y Sexo.**

Rango de Edad	Edad y Sexo			Porcentaje
	Femenino	Masculino	TOTAL	
NR <sup>1</sup>	1	15	16	4.7
18 - 24	3	51	54	15.9
25 - 31	5	70	75	22.1
32 - 38	10	76	86	25.4
39 - 45	1	58	59	17.4
46 - 52	3	31	34	10.0
53 - 64	0	15	15	4.4
<b>TOTAL</b>	<b>23 (7%)</b>	<b>316 (93%)</b>	<b>339</b>	<b>100%</b>

<sup>1</sup>NR: No respondieron.

Gráfico 3.

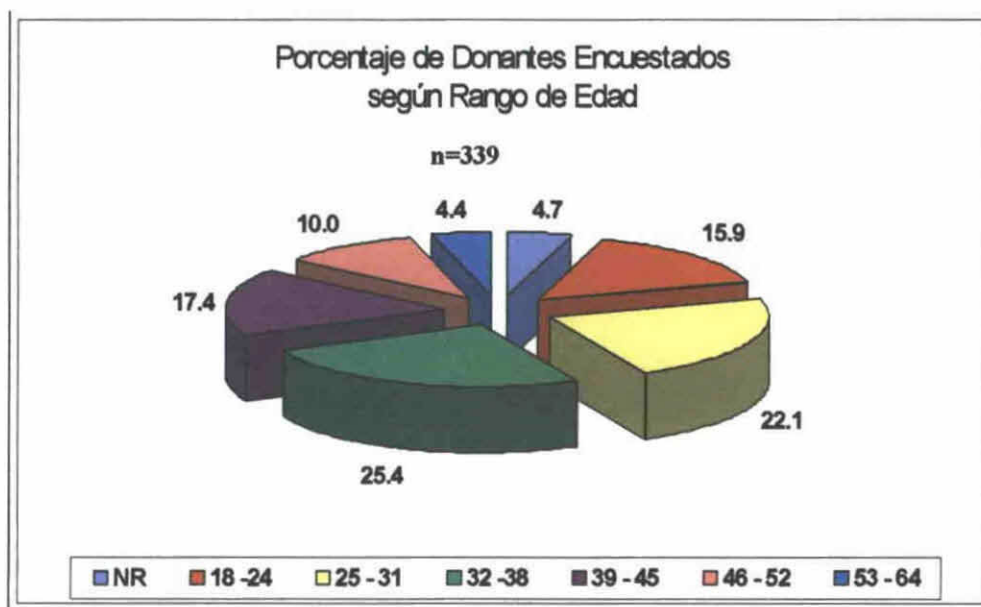
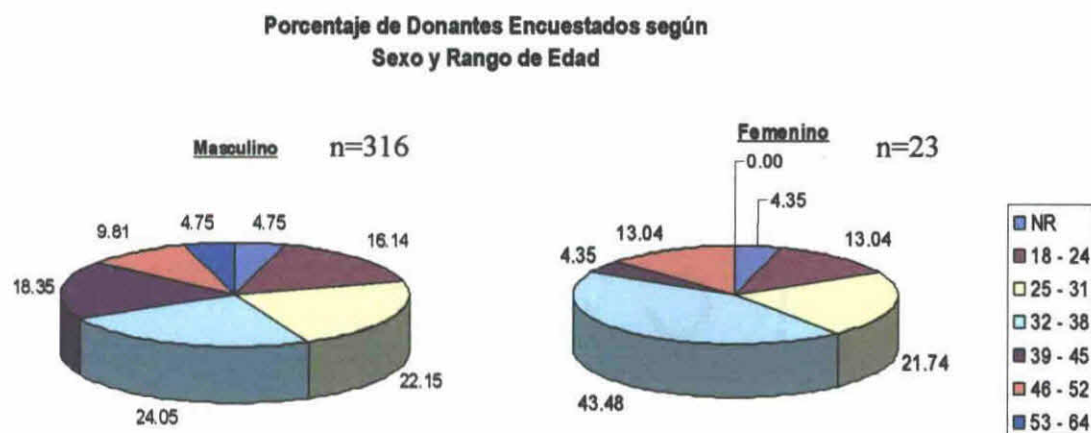


Gráfico 4.



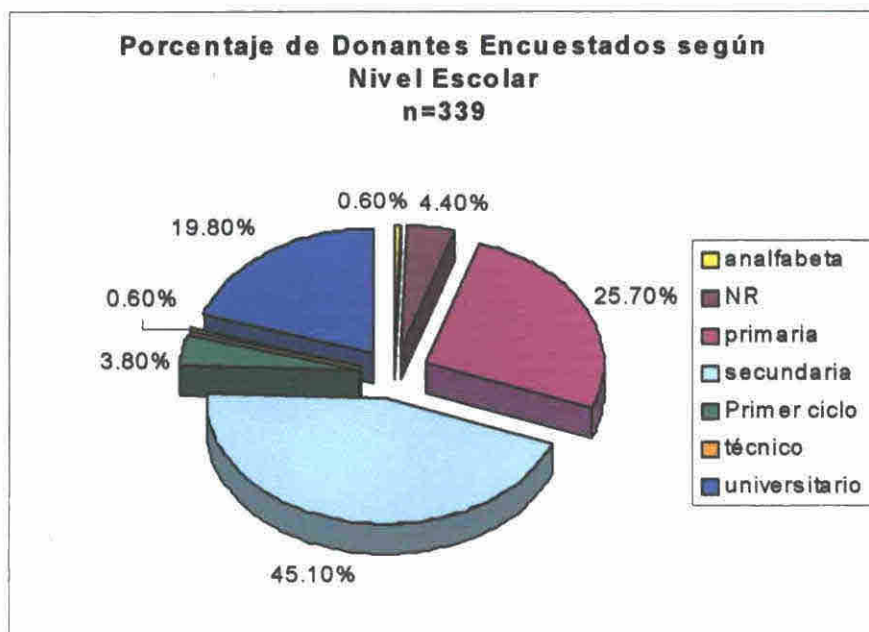


- b. Sexo: El 93% (316/339) de la población encuestada fue del sexo masculino. Ver Tabla 7.
- c. Nivel escolar: El 48.9 % (166/339) de los donantes encuestados habían alcanzado el nivel secundario (Primer ciclo o secundaria completa). Sólo el 19.8% (67/339) han alcanzado el nivel universitario. Ver Tabla 8. Ver Gráfico 5.

**Tabla 8. Frecuencia y Porcentaje de la población encuestada Según Nivel Escolar y Sexo**

Nivel escolar						
Nivel escolar	Masculino		Femenino		Frecuencia	Porcentaje
	Frecuencia	%	Frecuencia	%		
analfabeta	2	0.6	0	0	2	0.60%
primaria	85	26.9	2	8.7	87	25.70%
Primer ciclo	11	3.5	2	8.7	13	3.80%
secundaria	148	46.8	5	21.7	153	45.10%
técnico	2	0.6	0	0	2	0.60%
universitario	54	17.1	13	56.5	67	19.80%
NR	14	4.4	1	4.3	15	4.40%
Total	316	99.9	23	99.9	339	100.00%

**Gráfico 5.**



d Estado Civil el 74.2% (252/339) de los donantes encuestados mantienen una relación de pareja Ver Tabla No 9

**Tabla 9 Numero de Donantes Encuestados, segun Estado Civil**

Banco de Sangre	Casados	Unidos	Solteros	Separados	Viudos	NR <sup>1</sup>	TOTAL
Banco de Sangre	22	55	18	0	0	0	95
CHAAM	39	32	23	0	0	0	94
CHAMAG	19	19	10	0	0	2	50
Dr. D de Obaldía	19	14	17	0	0	0	50
Dr. Hernández	23	10	15	1	1	0	50
TOTAL y porcentaje	122(35.9%)	130(38.3%)	83(24.4%)	1(0.3%)	1(0.3%)	2(0.6%)	339(100%)

R<sup>1</sup> N Respondieron

e Más de una pareja habitual el 6 % (20/339) de los encuestados admitieron tener más de una pareja habitual (ver Tabla No 10 y gráfico 6) distribuidos en diferentes grupos de edad (ver Gráfico 7) quienes procedían principalmente del Banco de Sangre del CHAAM Ver Gráfico 8 Esta variable es un factor de riesgo importante para adquirir la infección por VHB

**Tabla No 10 Distribución de Donantes Encuestados segun la Variable Mas de una pareja habitual**

Más de una pareja habitual	Frecuencia	Porcentaje
No	291	85.8%
Si	20	5.9%
NR	28	8.3%
Total	339	100.0%

Gráfico 6.

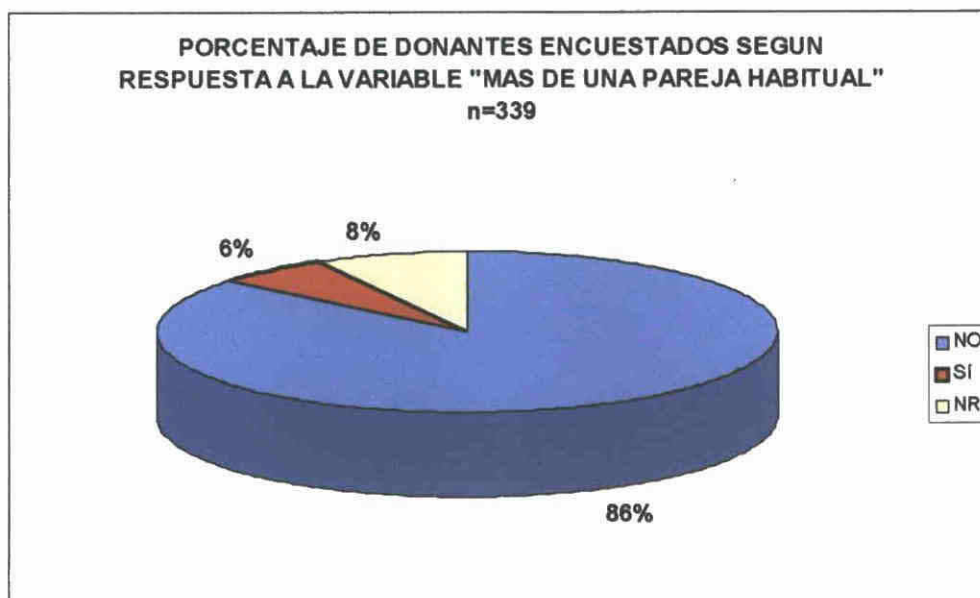
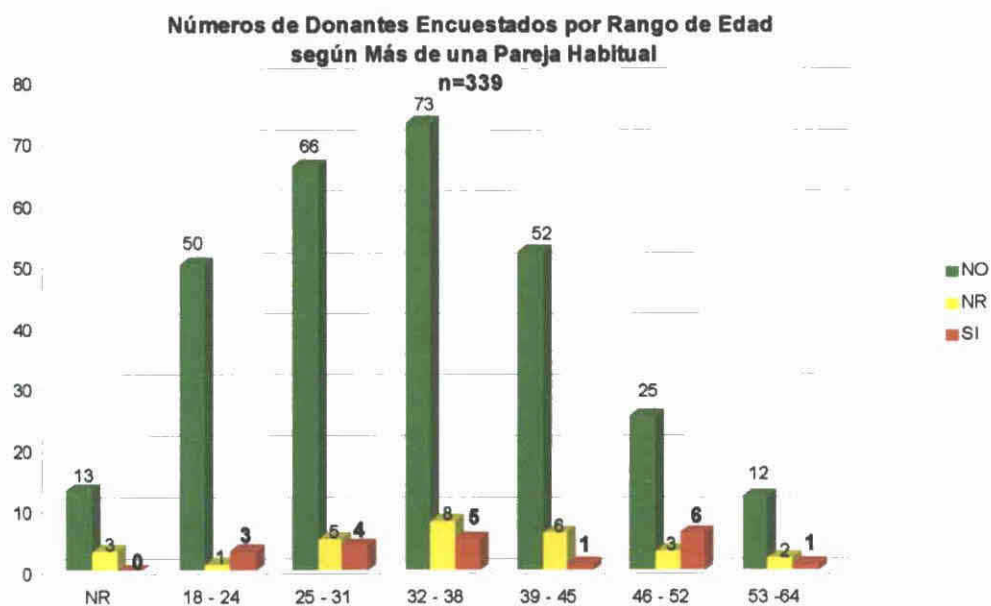
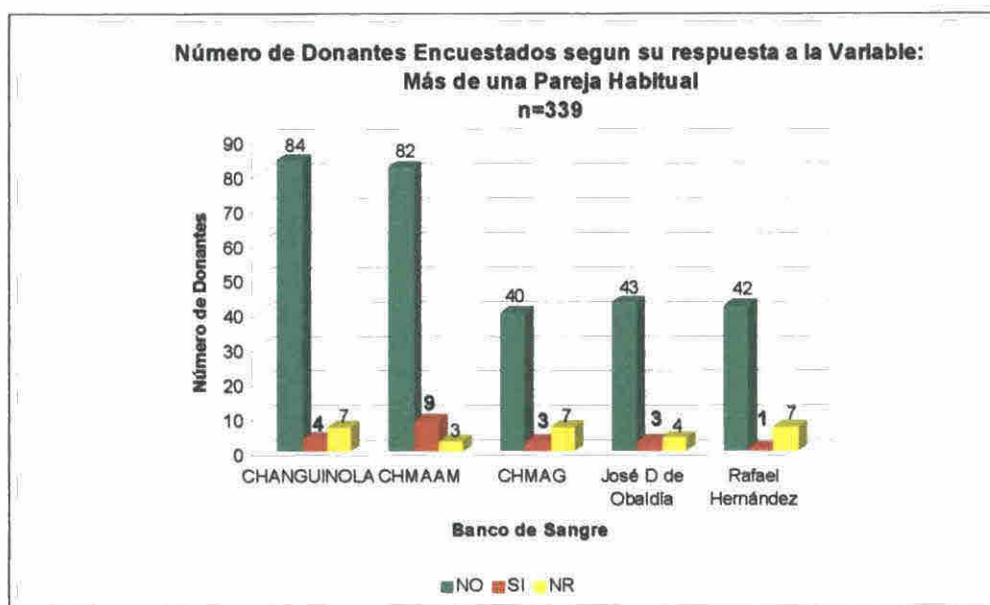


Gráfico 7.

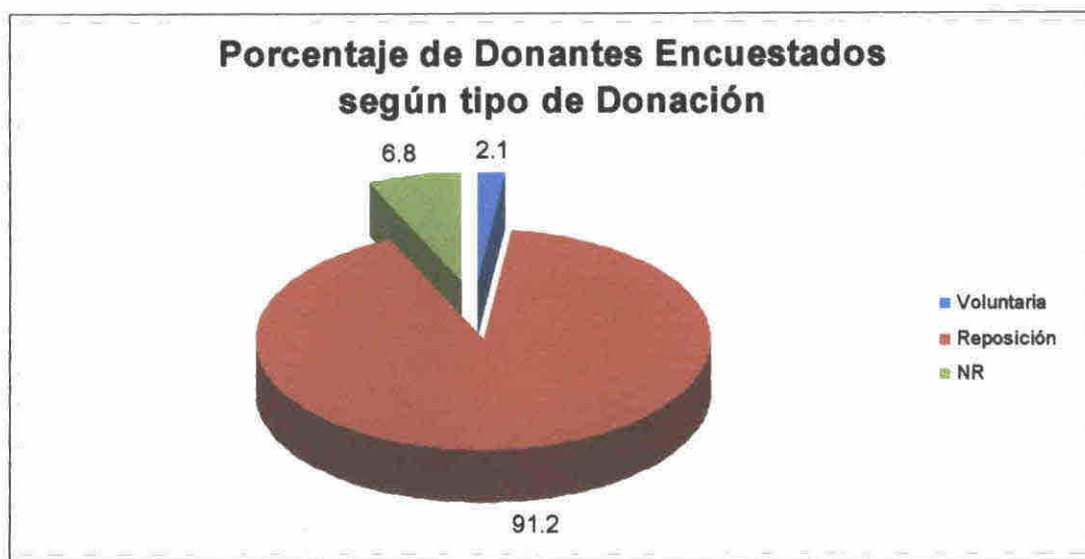


**Gráfico 8.**

- e. Tipo de Donación: el 91.2% (309) de las donaciones fueron de reposición, que era lo esperado en Panamá donde la mayoría de las donaciones es para familiares y amistades. Ver Tabla No.11 y gráfico 9. Sólo el 2.1% (7) fueron donantes voluntarios, que es un porcentaje similar al del nivel nacional (Fuente: Red Nacional de Bancos de Sangre, año 2006)

Tabla No.11 Distribución de Donantes Encuestados Según el Tipo de Donación.		
Tipo de Donación	Frecuencia	Porcentaje
Voluntaria	7	2.1
Reposición	309	91.2
NR	23	6.8
Total	339	100.0

Gráfico 9.

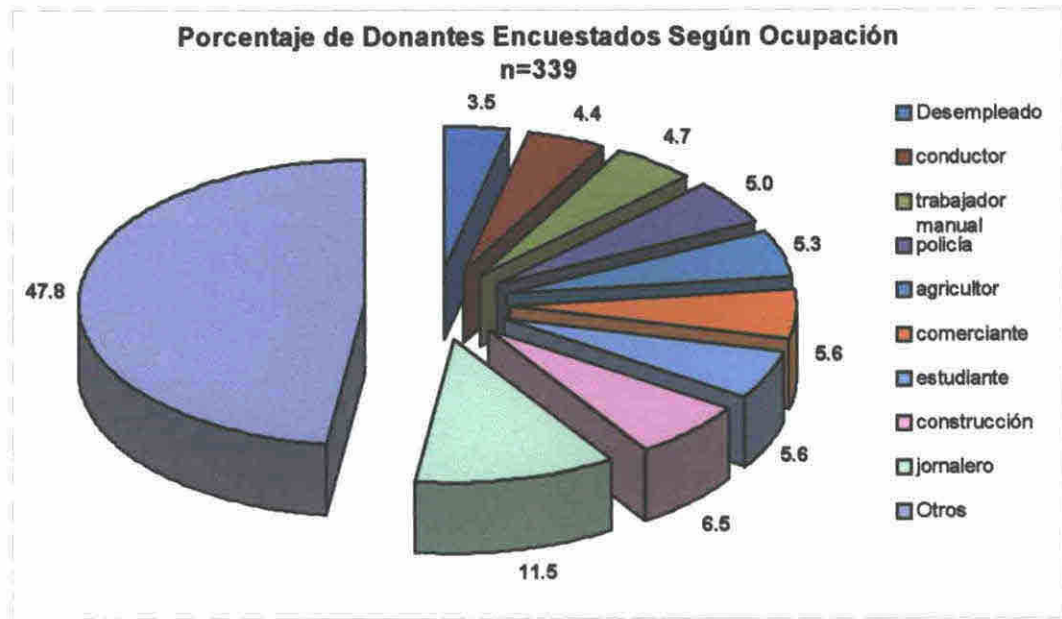


f. Ocupación: En este estudio participaron donantes con diferentes ocupaciones y desempleados. El 11.5% eran jornaleros de las fincas de Changuinola. Ver Tabla 12 y Gráfico 10.

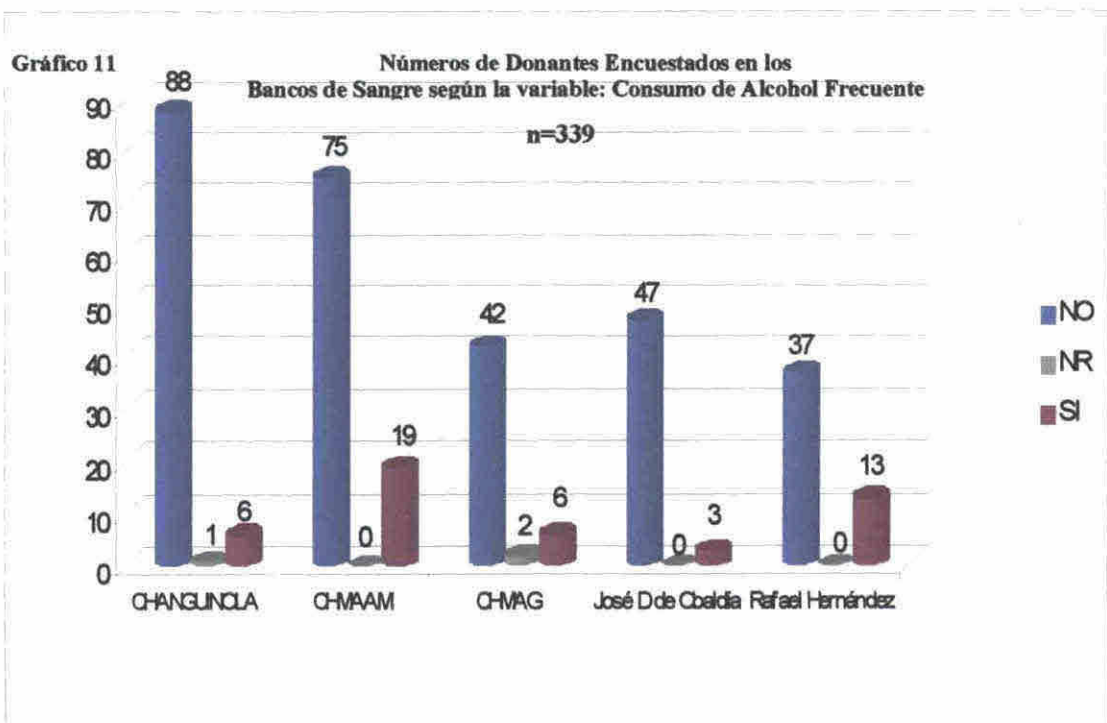
Tabla No.12 Distribución de Donantes Encuestados Según Ocupación		
Ocupación	Frecuencia	Porcentaje
Desempleado	12	3.5
conductor	15	4.4
trabajador manual	16	4.7
policía	17	5.0
agricultor	18	5.3
comerciante	19	5.6
estudiante	19	5.6
construcción	22	6.5
jornalero	39	11.5
Otros*	162	47.8
Total	339	100%

\*Las ocupaciones de menor frecuencia.

Gráfico 10.



h. Consumo de Alcohol Frecuente: El 14% (47/339) de los encuestados admitieron el consumo de alcohol frecuente, procedentes principalmente del Banco de Sangre del CHAAM. Ver Gráfico 11.



i Hábitos Sexuales El 96 8% (328) de los encuestados son heterosexuales

Ver Tabla 13

Tabla 13  
Distribución de Donantes Encuestados según Hábitos sexuales

Hábitos sexuales	Frecuencia	Porcentaje
Heterosexual	328	96 8%
Homosexual	1	0,3%
NR <sup>1</sup>	10	2,9%
Total	339	100 0%

NR<sup>1</sup> No respondieron

j Episodio de Ictericia Solo el 1 5% (5) de los donantes informo sobre esta variable Ver Tabla 14

Tabla 14  
Distribución de Donantes Encuestados segun la Variable Episodios de ictericia

Episodio de ictericia	Frecuencia	Porcentaje
NO	333	97,6%
SI	5	1,5%
NR <sup>1</sup>	1	0,3%
Total	339	100 0%

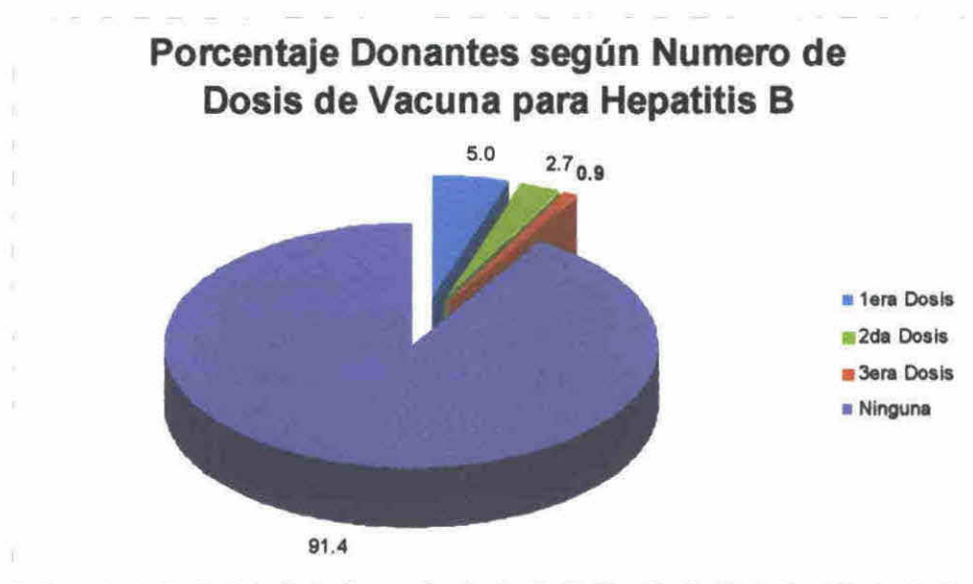
NR<sup>1</sup> No respondieron

k Uso de Medicamentos y Padecimiento El 97% (329/339) de los encuestados dijeron no tener ningun padecimiento y el 67% (227/339) de los encuestados usualmente no usan medicamentos

m. Vacuna de hepatitis B: Sólo el 0.9% (3) completaron la serie de tres dosis, esto fue verificado con la tarjeta de vacunación para los que la tuvieron disponible. Ver Tabla 15 y gráfico 12.

<b>Tabla 15. Número y Porcentaje de Donantes Encuestados según Número de Dosis de Vacuna de Hepatitis B.</b>		
Dosis	Frecuencia	Porcentaje
1era Dosis	17	5.0
2da Dosis	9	2.7
3era Dosis	3	0.9
Ninguna	310	91.4
<b>Total</b>	<b>339</b>	<b>100</b>

**Gráfico 12.**



n. Residencia: Sobresalen en el análisis de esta variable, las fincas de Changuinola donde viven la mayoría de los donantes de este distrito. Ver Anexo No.14.



### B Resultados de la Fase Serológica.

De los 339 donantes del estudio 11 5% (39) tenían muestras con resultados anti HBc positivos e indeterminados (ver Tabla 16 y Gráfico 13) Se reconfirmaron positivas 86% (31/36)<sup>1</sup> de las muestras analizadas mediante el ensayo de referencia, Quimioluminiscencia Amplificada en el equipo Vitros Eci cinco muestras resultaron anti HBc negativas con este ensayo Debido a limitantes como el transporte y el tiempo de llegada de las muestras al ICGES LCRSP todas las muestras de reserva tomadas en tubos de EDTA, llegaron hemolizadas y algunos sueros llegaron con muy poco volumen para realizarles los análisis completos de la fase serológica y molecular

Los datos demográficos y las respuestas a las variables del “Formulario de Recolección de Datos” de los donantes analizados en la Fase serológica del estudio se presentan en la Tabla 17

**Tabla 16** Número de Donantes Anti HBc positivos e Indeterminados, según Banco de Sangre

<u>Banco de Sangre</u>	<u>No. Donantes anti HB</u> <u>Positivos</u> <u>en los Bancos de Sangre</u>	<u>No. de Donantes Anti HB Indeterminados en los</u> <u>Bancos de Sangre</u>
Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía	4 (1.2 /)	0
Hospital Regional Rafael Hernández	1(0.3 /)	0
Hospital de Changuinola	27 (8.5 %)	0
Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid	1 (0.3 /)	1 (0.3 /)
Complejo Hospitalario Dr. Manuel Amador Guerrero	2 (0.6 %)	1
Hospital Santo Tomás	0	0
Total	37 (10.9%)	2 (0.58 /)

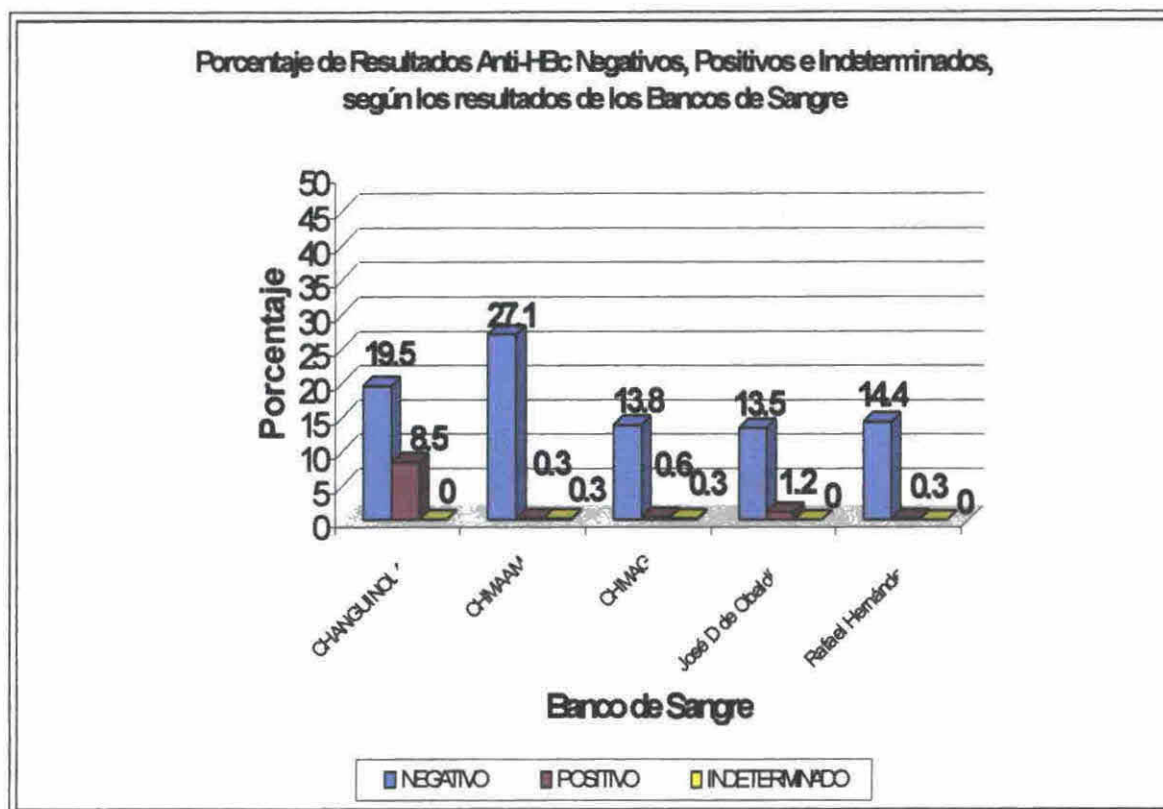
<sup>1</sup> Fueron eliminadas 3 muestras que llegaron con poco volumen de suero Ver Tabla 17

Tabla No.17

## INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ANTI-HBcORE POSITIVOS

No.	Banco de Sangre	Número de entrada	Sexo	Edad	Ocupación	Nivel escolar	Estado civil	Residencia	Tipo de donación	Hábitos sexuales	Más de una pareja habitual	Modo de ingreso	Padece de rto	Episodio de fiebre frecuente	consumo de alcohol frecuente	Vacuna para Hepatitis B	Síntomas de resfriado en los últimos 2 meses	Resultado de Hepatitis B core			
			M	F					COLFEMH	PROFESION						1 dosis	2 dosis	3 dosis	n		
11	José D de Coaldá	11	0	32	ayudante genl	primaria	soltero	caño abajo	x	heterossexual	si	NR	ninguno	no	si				x	si	Positivo
16	José D de Coaldá	18	1	32	agricultor	secundaria	soltero	resacimiento	x	heterossexual	si	NR	ninguno	no	no				x	no	Positivo
40	José D de Coaldá	40	1	20	ninguna	tercer año	soltero	boca del monte	x	heterossexual	si	NR	ninguno	no	no				x	no	Positivo
48	José D de Coaldá	49	1	36	mercader	secundaria	casado	divid	x	heterossexual	no	NR	ninguno	no	no				x	no	Positivo
40	Rafael Hernandez	05-1859	1	36	vendedor	secundaria	casado	bugaba	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	no				x	no	Positivo
1	CHANGUINOLA	05-886	1	37	jornalero	primaria	casado	changuinola fca 42	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	no				x	no	Positivo
2	CHANGUINOLA	05-614	1	23	jornalero	secundaria	casado	changuinola fca 12	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	no				x	no	Positivo
13	CHANGUINOLA	05-632	1	37	inspector	secundaria	casado	el silencio	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	no				x	no	Positivo
20	CHANGUINOLA	05-639	1	32	jornalero	secundaria	casado	fca 15	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	no				x	no	Positivo
24	CHANGUINOLA	05-643	1	23	bachero	secundaria	casado	changuinola fca 32	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
39	CHANGUINOLA	05-722	1	37	jornalero	primaria	casado	changuinola fca 65	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
40	CHANGUINOLA	05-724	1	36	jornalero	primaria	casado	changuinola fca 65	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
44	CHANGUINOLA	05-729	1	29	jornalero	primaria	casado	changuinola fca 65	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
47	CHANGUINOLA	05-732	1	29	agricultor	primaria	casado	valle del risco	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
51	CHANGUINOLA	05-744	1	31	jornalero	primaria	casado	changuinola fca 67	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
52	CHANGUINOLA	05-745	1	46	conductor	secundaria	casado	changuinola	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
53	CHANGUINOLA	05-750	1	46	jornalero	primaria	casado	quabito, la mesa	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
54	CHANGUINOLA	05-751	1	37	jornalero	primaria	casado	el empujate, planta de	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
55	CHANGUINOLA	05-759	1	35	jornalero	secundaria	casado	molde	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
57	CHANGUINOLA	05-761	1	20	desempleado	primaria	casado	changuinola fca 85	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
61	CHANGUINOLA	05-766	1	32	estibador	primaria	casado	changuinola	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
66	CHANGUINOLA	05-775	1	32	jornalero	secundaria	casado	stracho, Costa Rica	NR	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
69	CHANGUINOLA	05-778	1	23	jornalero	secundaria	casado	codon	NR	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
75	CHANGUINOLA	05-789	1	29	jornalero	secundaria	casado	changuinola	NR	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
83	CHANGUINOLA	05-797	1	29	desempleado	primaria	casado	cusapin, Rio Caba	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
85	CHANGUINOLA	05-802	1	41	seguridad	secundaria	casado	empalmé Lincoln Creek	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
86	CHANGUINOLA	05-803	1	24	agricultor	primaria	casado	changuinola	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
87	CHANGUINOLA	05-806	1	32	maestro	secundaria	casado	changuinola	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
88	CHANGUINOLA	05-808	1	43	agricultor	secundaria	casado	el empujate	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
91	CHANGUINOLA	05-813	1	23	abuelo	secundaria	casado	el silencio	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
36	CHMAG	06-1910	1	25	marino	secundaria	casado	Calabé	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
18	CHMAG	06-1872	1	30	estibador	secundaria	casado	san Juan	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
29	CHMAG	06-1866	1	55	trabajador manual	secundaria	casado	Sabanetas	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	si	Positivo
80	CHMAM	07-03194	1	59	tioperto	secundaria	casado	calabota	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo
44	CHMAM	07-02328	1	64	no trabaja	secundaria	casado	alcázar diluz	x	heterossexual	si	ninguno	ninguno	no	si				x	no	Positivo

Gráfico 13.



- Información Epidemiológica de los Donantes Encuestados Anti-HBc Positivos:

De la Tabla 17 se resume que el 100% de los donantes analizados son hombres, sus edades oscilan entre 20 y 64 años. El 47% (17/36) finalizaron el nivel de escolaridad primario; el 44% (16/36) alcanzaron el nivel secundario de primer ciclo o sexto año y el 5.5% (2/36) alcanzó el nivel universitario. El 78% (28/36) tenían una relación de pareja, 97% (35/36) son heterosexuales, 77% (28/36) no utilizan medicamentos, 97% no tenían ningún padecimiento y el 100% no había presentado episodio de ictericia. El 19% (7/36) admitió consumo de alcohol frecuente y el 100% no habían recibido la vacuna de VHB.

- Marcadores Serológicos

A los confirmados anti HBc+ y anti HBc negativos se les determinaron otros marcadores serológicos como el HBsAg y otros no rutinarios en los Bancos de Sangre como el HBeAg el anti HBe y anti HBs. El anti HBc IgM se determinó sólo a los anti HBc negativos. En la tabla 18 se describe con más detalle el número de donantes analizados en la Fase Serológica. Los resultados de los donantes confirmados se presentan en la Tabla 19 se incluyó la variable 'Más de una Pareja Habitual

**Tabla 18** Numero de Donantes analizados en la Fase Serológica.

<i>No de Donantes Anti HBc+ en los Bancos de Sangre</i>	<i>No de Donantes Anti HBc+ confirmados en el ICGES-LCRSP (Positivos s/co&lt;10)</i>	<i>Resultado anti HBc Negativo</i>	<i>No de Donantes Confirmados y Analizados con otros Marcadores Serológicos</i>	<i>No de Donantes anti HBc negativos y analizados con otros Marcadores Serológicos</i>
36	31	5	26	5

De la Tabla 19 se desprende, que el 26% (8/31) tenían dos marcadores adicionales al anti HBc

- Determinación del marcador HBeAg

Este marcador HBeAg se determinó en todas las muestras anti HBc+. Sólo 1 muestra fue HBeAg positiva, indicando replicación viral activa, en este donante sin embargo este marcador se debe manejar conjuntamente con el resultado de anti HBe y el ADN viral. La presencia de ADN viral no pudo ser confirmada por Nested PCR, debido a que no

**Tabla No.19**  
**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS**

Número de Donante	BANCO DE SANGRE	ESTUDIO POR:					
		anti-HBcore total	HBsAg	anti-HBe	anti-HBs Pos>12 mU/ml Neg < 8 mU/ml	HBsAg	HBc-IgM
1	05-1859	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO >10000/1000	NEGATIVO	Más de una Pareja Habitual *
2	05-1860	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	DUDOSO 8 5/10 3	NEGATIVO	No
3	05-1861	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 92,300	NEGATIVO	SI
4	05-1862	POSITIVO	NEGATIVO	Límite 0.81/0.89	POSITIVO 56.6	NEGATIVO	SI
5	05-1863	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO 2.0	NEGATIVO	No
6	05-1864	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO 20.0	NEGATIVO	SI
7	05-1865	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 25.3	NEGATIVO	No
8	05-1866	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO 0.0	POSITIVO	No
9	05-1867	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	DUDOSO 9.0	NEGATIVO	No
10	05-1868	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO 16	POSITIVO	No
11	05-1869	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	SI
12	05-1870	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 12.5	NEGATIVO	No
13	05-1871	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 116	NEGATIVO	No
14	05-1872	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 172	NEGATIVO	SI
15	05-1873	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO 4.8	NEGATIVO	No
16	05-1874	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 305	NEGATIVO	No
17	05-1875	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO 0.0	NEGATIVO	No
18	05-1876	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO 538	NEGATIVO	No
19	05-1877	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 28.3	NEGATIVO	No
20	05-1878	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO 0.0	CIM	No
21	05-1879	POSITIVO	POSITIVO	CIM	POSITIVO 76.4	NEGATIVO	No
22	05-1880	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 20.2	NEGATIVO	SI
23	05-1881	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO 341	NEGATIVO	No
24	05-1882	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 179	NEGATIVO	No
25	05-1883	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 310	NEGATIVO	No
26	05-1884	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO 0.0	NEGATIVO	No
27	05-1885	POSITIVO	NEGATIVO	CIM	CIM	NEGATIVO	No
28	05-1886	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO 0.0	CIM	No
29	05-1887	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	No
30	05-1888	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO 0.0	CIM	No
31	05-1889	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	CIM	NEGATIVO	No
32	05-1890	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO 7330	NEG 0.18	No
33	05-1891	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO 0.0	NEG 0.15	NEGATIVO
34	05-1892	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 41.1	NEG 0.17	No
35	05-1893	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO 23.3	NEG 0.10	no
36	05-1894	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NR

CIM: Cantidad insuficiente de Muestra.  
Se incluyó la respuesta a la variable Más de una Pareja Habitual.

teníamos suficiente muestra. El donante no pudo ser localizado para tomarle nueva muestra.

- Determinación del marcador anti HBe.

Para el anti HBe 41.9% (13/31) muestras confirmadas anti HBc+ (eran anti HBe+ 2 muestras no tenían cantidad suficiente). La presencia de este anticuerpo en casi la mitad de los donantes conjuntamente con el anti HBc confirma el contacto de estos donantes con el VHB y descarta falsos positivos.

- Determinación de marcador anti HBs

Se hizo la determinación de anti HBs para los 31 donantes anti HBc+. Para este marcador 64.5% (20/31) de los donantes anti HBc+ tenían niveles de anti HBs entre 20 mUI/ml a 92.300 mUI/ml. 6.45% (2/31) de estos donantes tenían niveles dudosos entre 8.1 mUI/ml a 10 mUI/ml. 22.5% (7/31) tenían niveles <8 mUI/ml o sea negativos y 2 muestras sin cantidad suficiente para su determinación.

- Determinación del marcador HBsAg.

Se hizo la determinación del HBsAg para confirmar que todas las muestras confirmadas fueran anti HBc positivas/ HBsAg negativas. De estas 4/31 muestras anti HBc+ no pudieron ser analizadas con este parámetro una de ellas inicialmente HBsAg+. Las muestras F.A.05.632 anti HBc+ y J.B.S. 05.722 fueron confirmadas HBsAg+. A estas muestras se les hizo Nested PCR y Carga Viral para comprobar la presencia del virus. Estos donantes se consideran portadores crónicos asintomáticos del VHB. Ninguno de



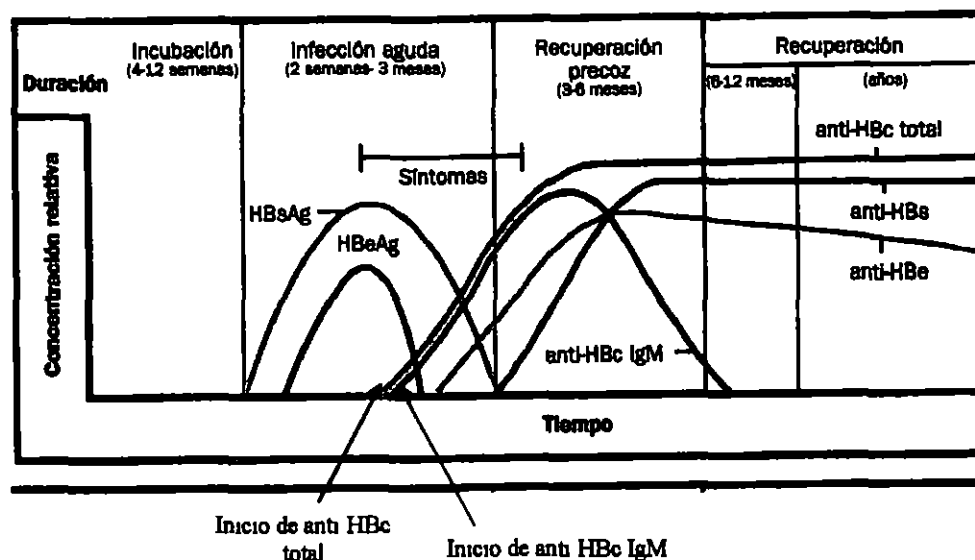
estos dos donantes tenían anti HBs y uno tenía anti HBe éste último admitió tener más de una pareja habitual

- Determinación del marcador anti HBc IgM.

Se determinó el anti HBc IgM a las 5 muestras confirmadas anti HBc negativo y los otros marcadores serológicos no rutinarios en los Bancos de Sangre resultando todos negativos

Este resultado era el esperado si se toma como referencia el esquema del perfil serológico del 75-85% de los pacientes con VHB. El esquema muestra que el marcador anti HBc total aparece un tiempo antes que el anti HBc IgM. Por tanto es difícil tener una muestra anti HBc total negativa/anti HBc IgM + Ver Figura 13

Figura 13



C. Resultados de la Fase Molecular.

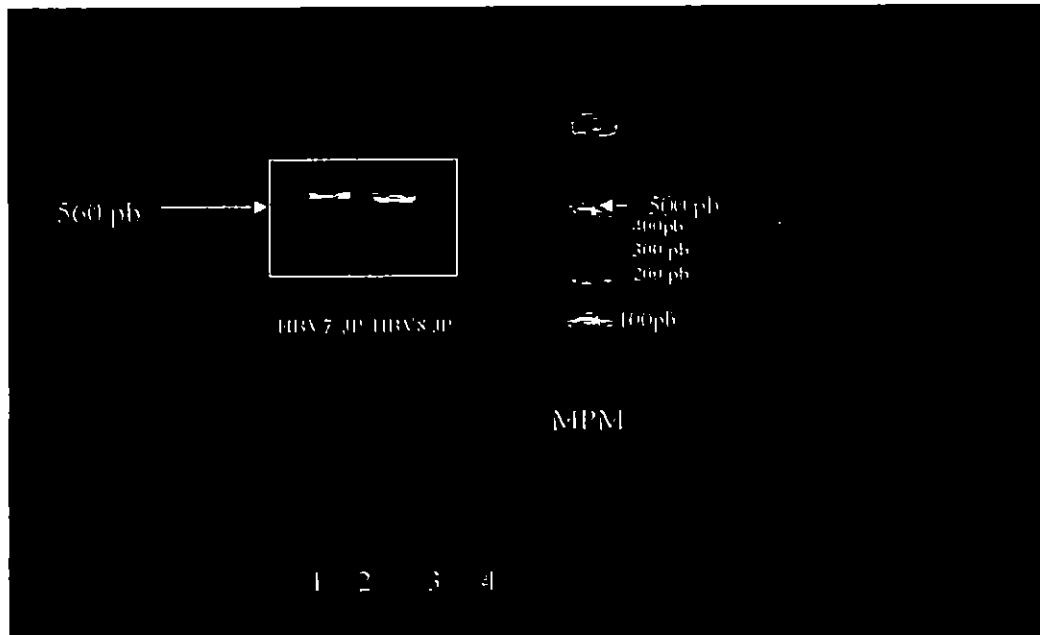
C 1 Estandarización de la PCR y Nested PCR con controles positivos conocidos

Se logró la estandarización de la PCR y Nested PCR, en donde se esperaban fragmentos de 560 pb y 411 pb respectivamente usando sueros controles con patrones serológicos conocidos provenientes de la seroteca del ICGES LCRSP Ver Foto No 2 Foto No 3 y Tabla No 20

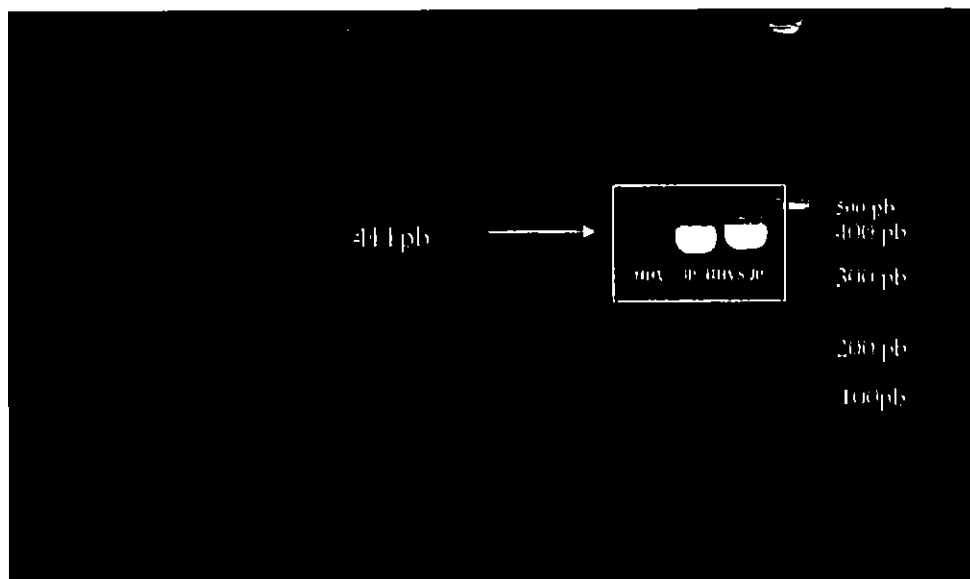
**Tabla 20 Resultados de los Marcadores Serológicos de los Controles Positivos**

Nombre del Control	Marcadores Serológicos			
	<i>HBsAg</i>	<i>HBeAg</i>	<i>Anti HBe</i>	<i>Anti HBs</i>
HBV7 JP	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
HBV8 JP	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo





**Foto No.2** Obsérvese las bandas obtenidas con la PCR (posiciones 1 y 2 en el recuadro) la banda esperada era de un peso molecular de 560 pb. En este caso se observaron claramente las bandas debido a que estas muestras tenían una cantidad elevada de ADN viral. Contando las bandas del Marcador de Peso Molecular de abajo hacia arriba se observa que las bandas obtenidas están entre los 500 y 600 pb. Las posiciones 3 y 4 son controles negativos.

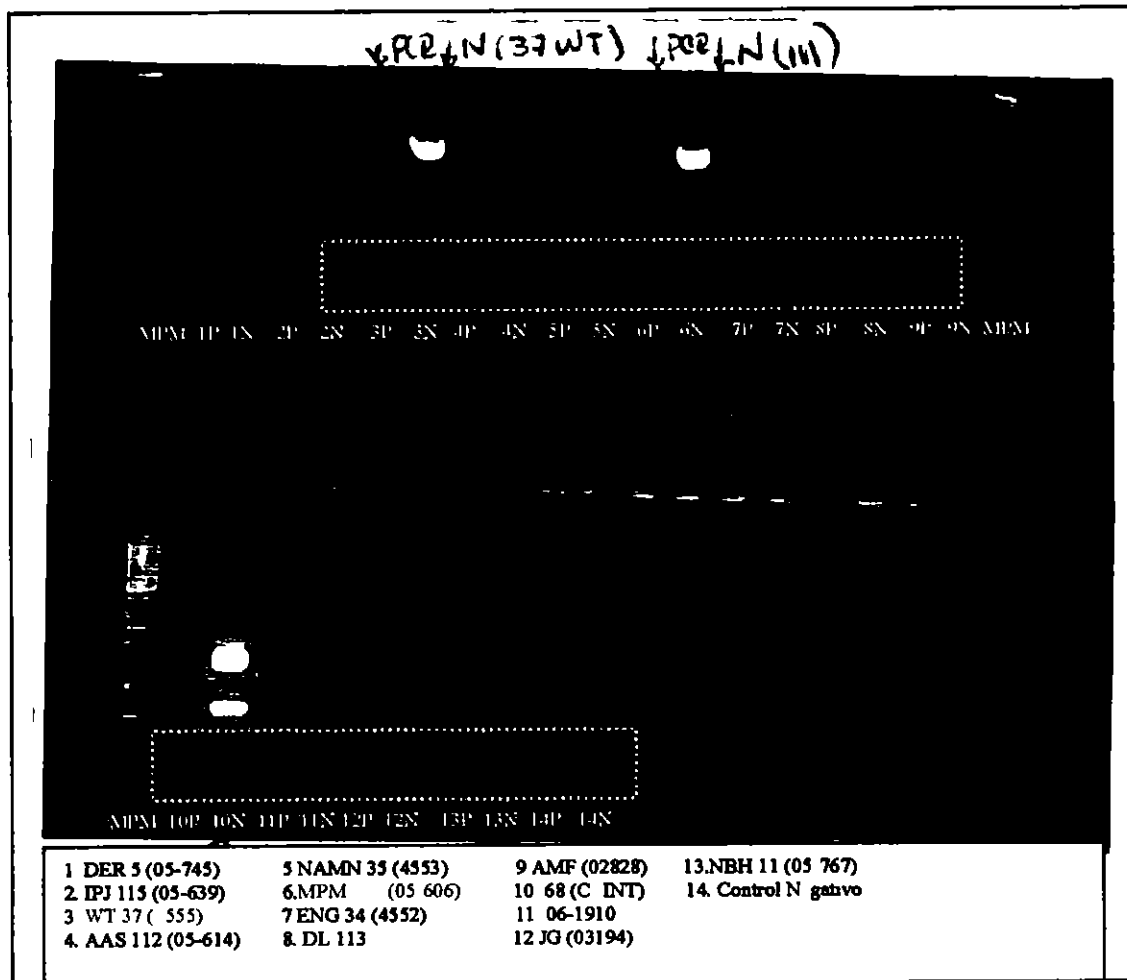


**Foto No.3** Obsérvese los fragmentos gruesos y brillantes de 411 pb (en el recuadro) obtenidos con la Nested PCR. Ayudándonos del Marcador de Peso Molecular se observa que las bandas obtenidas están ubicadas entre los 400 y 500 pares de bases.

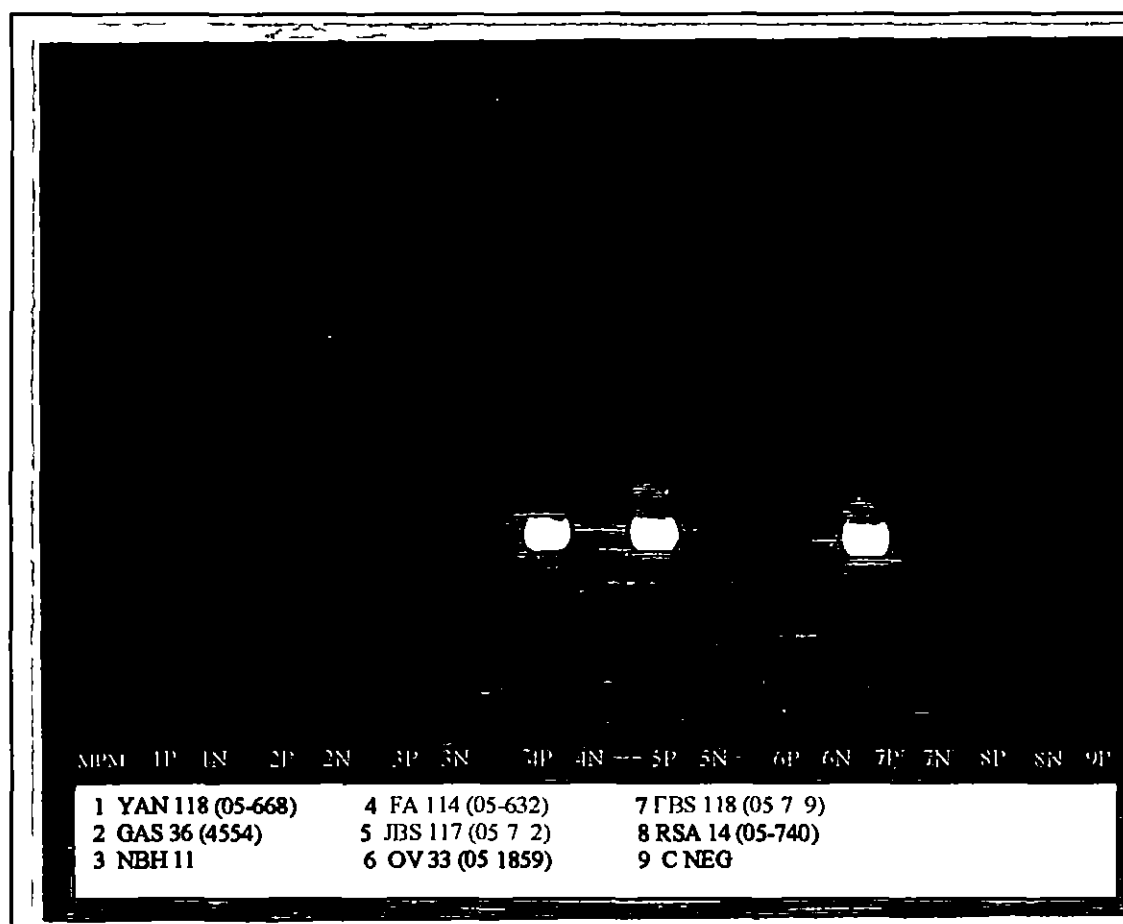
**C 1 2 Resultados obtenidos mediante la técnica de PCR y Nested PCR para las muestras de donantes confirmados**

En total se amplificó el 60/ de las muestras (20/36) entre anti HBc+ y anti HBc negativas. Hubo reproducibilidad de las amplificaciones con los cebadores para PCR y para Nested al repetir varias muestras en diferentes momentos.

Solo en algunas de las corridas se aprecia el producto de 560 pb de la PCR. Debido a que la cantidad de ADN extraído es diferente en cada extracción. Lo importante es observar la banda de 411 pb en la Nested PCR, ya que confirma que hubo extracción y amplificación aunque sea de poca cantidad. Ver Foto No 4

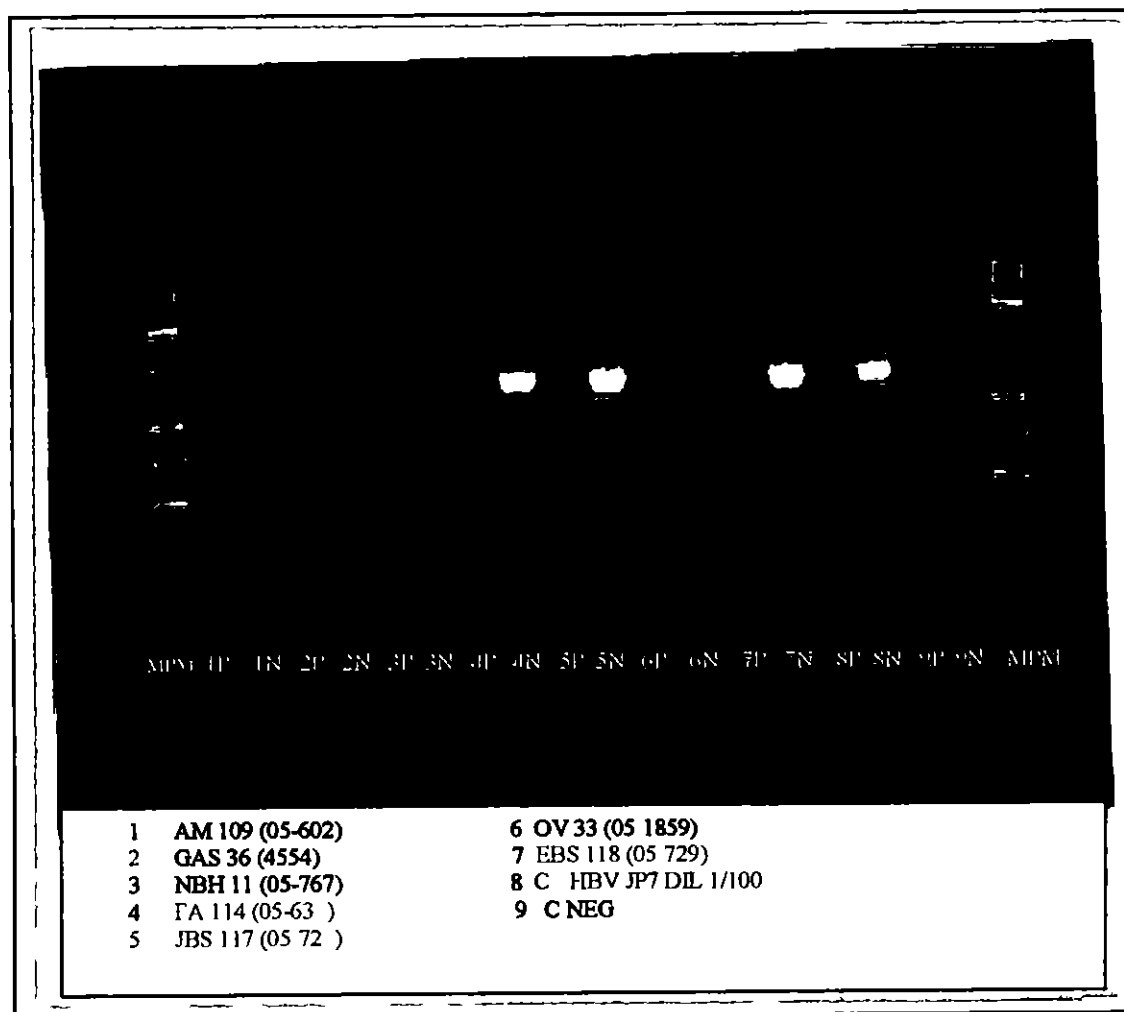


**Foto No 4** En la parte superior del gel se corrieron 9 muestras (1P 9N) el producto amplificado de PCR se colocó primero y seguido el producto de Nested de la misma muestra. Se puede observar la banda tenue de 560 pb junto a la banda brillante de 411 pb en las muestras 3 y 6. En la parte inferior del gel se corrió una muestra de la seroteca del ICGES (10P 10N) una muestra HBsAg+ de un estudio anterior en la Comunidad China, obsérvese que aparte de la banda de 411 pb aparece otra muy brillante de aproximadamente 200 pb. Esta muestra se amplificó varias veces en distintos días manteniendo el mismo patrón de dos bandas; se usó como control positivo interno en las corridas de las muestras de los donantes. Las muestras 11, 12 y 13 son muestras que fueron confirmadas anti HBc Negativas; ninguna amplificó ni en PCR ni en Nested. Las bandas muy tenues encerradas en recuadro rojo son los dímeros de cebadores formados P PCR, N Nested.



**Foto No.5** En esta corrida las muestras 4 5 y 7 son positivas con Nested PCR, no se observan muy claramente los marcadores de peso molecular

De las 20 muestras 5 (25 /) tenían ADN VHB 2 HBsAg+ y 3 HBsAg negativas Estos resultados concuerdan con los resultados de otros estudios en países de Latinoamérica como Arraes LC et al 2004 En Brasil en donde de 120 muestras anti HBc+ analizadas 13 eran ADN VHB positivo incluyendo 10 HBsAg+ y 3 HBsAg negativos Gutierrez C et al 2001 de Venezuela, encontró ADN VHB en 10% de las muestras anti HBc+ analizadas con ésta última autora tuvimos comunicación personal y amablemente nos proporcionó la secuencia de los cebadores para la Nested PCR.



**Foto No 6** Se observan más claramente las muestras positivas de la Foto No 5 En esta corrida se amplificó el control positivo diluido 1/100

La tabla 21 presenta una comparación entre los resultados de los marcadores serológicos para VHB y los resultados de Nested PCR

**Tabla 21. Comparación entre los resultados de los marcadores serológicos para VHB y los resultados de Nested PCR en las muestras de los donantes anti-HBc positivos y negativos confirmados.**

Nested PCR	Anti-HBc		HBsAg		Anti-HBs		Anti-HBe	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
(+)	0	5	3	2	3	2	2	3
(-)	5	12	15	0	6	9	12	3

Se analizaron 48.3% (15/31) de las muestras anti-HBc+ confirmadas, 5 fueron positivas que representa un 33% (5/15); 2 de éstas muestras eran anti-HBc+/HBsAg+ y 3 eran anti-HBc+/HBsAg-. De éstas 5, 2 tenían anti-HBs, y 3 tenían anti-HBe.

C.1.3 Determinación de la Carga Viral de ADN-VHB en muestras positivas por Nested PCR, por medio de la Técnica Monitor Test para VHB de Cobas Amplicor:

Las muestras se trabajaron en duplicado en dos anillos, cada anillo tiene capacidad para 10 muestras (7 pacientes y 3 controles), los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 22.

**Tabla 22. Resumen de Resultados de Carga Vírica de VHB.**

<b>No. Muestra y Control</b>	<b>Resultado en Anillo #1</b>	<b>Resultado en Anillo #2</b>	<b>Interpretación</b>
1. JBS 117	Target lo	Target lo	Carga Viral Indetectable
2. WT 37	QS INVALID	QS INVALID	Estándar de cuantificación invalidado
3.EBS 118	Target lo	Target lo	Carga Viral Indetectable
4.C+ HBV7 JP	3.04E2	3.01E2	<b>Carga viral detectada</b>
5.111 MPM	Target lo	Target lo	Carga Viral Indetectable
6.114 FA	2.17E2	2.28E2	<b>Carga Viral detectada</b>
7.AM	Target lo	Target lo	Carga Viral Indetectable
8. C HPC	1.26E4	1.23E4	Carga Viral detectada
9. C LPC	2.45E2	1.03E2	Carga Viral detectada
10.C NC	0.001	0.001	<0.099

Aparte del control positivo interno (C+HBV7JP), de las muestras analizadas con Monitor Test de VHB, sólo la muestra 114 FA, mostró una carga viral detectable. Los resultados en ambos anillos mostraron reproducibilidad, una de las muestras se invalidó y no pudo ser repetida debido a la poca cantidad disponible de suero. Los rangos para que los controles positivos fueran validados fueron los siguientes:

C LPC 6.0E1-5.4E2

C HPC 5.5E3-2.2E4

CN <0.099

La corrida fue valida ya que los controles cumplieron con los rangos establecidos a pesar de que el QS de la muestra WT 37 se invalido

#### **D Discusión**

Se obtuvo informacion epidemiológica directamente de los donantes de cinco Bancos de Sangre con el fin de relacionar estos datos con los resultados de la evaluacion serologica y molecular Actualmente en los Bancos de Sangre de Panama se realiza una entrevista medica antes de la donacion En este estudio los donantes se sentian mas cómodos llenando el cuestionario y respondiendo afirmativamente preguntas comprometedoras que en una entrevista medica hubiesen sido causa de rechazo para la donación En paises como Japón se hace una entrevista autoexcluyente en un computador antes de la donacion y se obvia la entrevista médica Esta innovación ha disminuido el descarte de unidades de sangre

Entre las variables analizadas más relacionadas con los resultados de la fase serologica y molecular están Más de una pareja habitual y el consumo de alcohol frecuente El 58% de los encuestados admitieron tener más de una pareja habitual y el 13.8% admitio el consumo de alcohol frecuente Es conocido que la primera variable es un factor de riesgo importante para adquirir la infeccion por VHB y la segunda podria contribuir a acelerar o agravar el desarrollo de una patologia hepatica en los anti HBc+ Estos comportamientos no son los esperados en donantes de sangre ya que se consideran personas habitualmente sanas Con este estudio se obtiene por primera vez en Panama información directamente del donante que permite relacionar estos comportamientos con un patron serologico de VHB el cual era uno de los objetivos del estudio Tomando en consideracion la edad de la poblacion donante y la transmision sexual como factor de



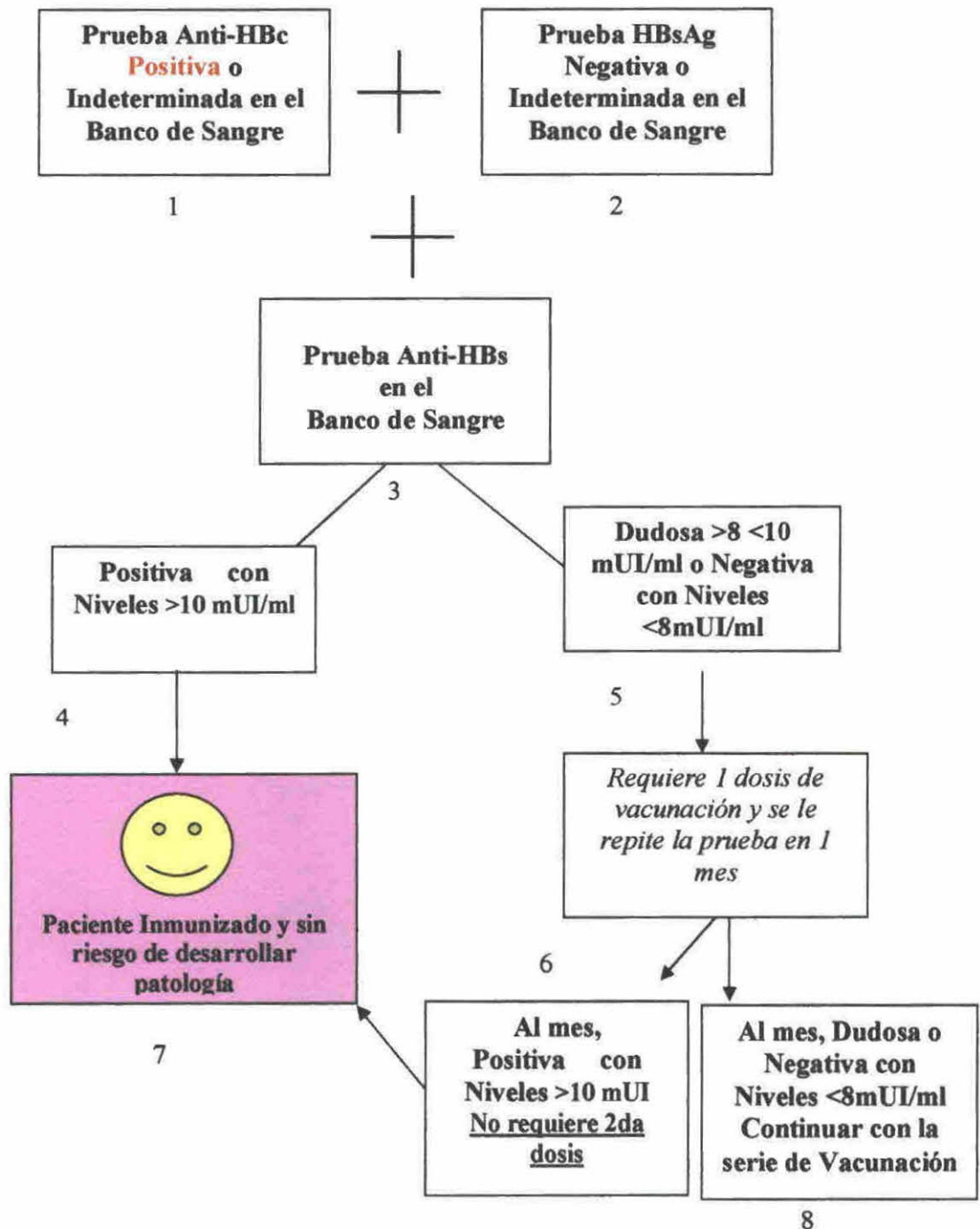
riesgo para adquirir la infección por VHB se estableció una hipótesis de investigación (H<sub>1</sub>) para la variable *Mas de una pareja habitual* (Sampieri R. et al 2000 pag 96 101) Utilizando la Escala de Actitudes de Likert, se demostró estadísticamente que la variable *Mas de una pareja habitual* guarda relación con el número de unidades anti HBc+ ( $p < 0.05$ ) en la población de donantes Ver Anexo No 15

Otro de los objetivos del estudio era determinar el número de donantes inmunizados con la vacuna de VHB Solo 86 / (29/339) de los donantes incorporados tenían entre 1 y 3 dosis de vacuna y el 914 / no tenían ninguna dosis de vacunación contra el VHB La información obtenida sugiere que los donantes de sangre son vulnerables a la infección por VHB hay que mencionar que entre los anti HBc+ ninguno estaba vacunado contra el VHB por tanto sería prudente establecer programas de vacunación entre los adultos iniciando con la población de Changuinola

El hecho de que en la fase serológica del estudio se encontraran 2 muestras con anti HBc+/ HBsAg+ y una muestra anti HBc+ /HBeAg+ indica replicación viral activa del VHB demostrando que estos donantes son portadores crónicos asintomáticos y además diseminadores potenciales del VHB Además más de la mitad de los anti HBc+ confirmados no tenían marcador anti HBe y sólo el 22.5 / tenían anti HBe y anti HBs estos resultados son preocupantes ya que la ausencia del primer marcador es de mal pronóstico para el desarrollo de una patología como CLD o HCC a largo plazo y la ausencia del segundo deja a este grupo vulnerable a una reinfección por VHB particularmente por tratarse de población joven adulta Para el seguimiento de los donantes recomendamos el establecimiento de la prueba Anti HBs en los Bancos de Sangre complementándola con la vacunación, ya que se evitará que el donante se

reinfecte por el efecto neutralizante de los anticuerpos. El siguiente flujograma presenta el manejo de los donantes anti-HBc+/HBsAg- o indeterminados, que sugerimos.

*Manejo Sugerido para el Donante Anti-HBc+:*



El costo de la prueba adicional de anti HBs es de \$4 00 por paciente con la metodología del Vitros Eci. Este costo varia de acuerdo a la metodología disponible en el Banco de Sangre. El Manejo Sugerido para el Donante anti HBc positivo de este estudio ya generara resultados favorables a largo plazo y se le da importancia al donante de sangre ya que se le está protegiendo de una futura reinfección y además se le protege del desarrollo de una futura patología como el CLD o HCC.

Consideramos que la vacunación mas importante si no se ha recibido debe ser en el nivel secundario de escolaridad ya que el 43.3% de la población que dona llega hasta este nivel además los adolescentes se encuentran expuestos a la infección por transmisión sexual.

La extracción de ADN se estandarizó en este estudio utilizando poco volumen de muestra de suero obteniendo resultados satisfactorios similares a los trabajos de Yotsuyanagi H et al 2001, Kaneko S et al 1989, Zaaijer H.L. et al 1994, Liang T.J. et al 1989 y Kessler H. et al 1998. Fue necesario introducir una modificación en la incubación de la muestra, tomando para ello varios tubos de extraídos al azar para comprobar la presencia del ADN utilizando cebadores que amplifican el gen que codifica para la GAPDH logrando comprobar satisfactoriamente la presencia de ADN en los extraídos.

Una desventaja de usar poco volumen de muestra es que existe la posibilidad de tener falsos negativos de acuerdo a los trabajos de Gutierrez C. et al 1999. Sin embargo en este estudio las muestras se consideraron positivas cuando fueron repetidamente amplificadas. Para la búsqueda de ADN de VHB en las muestras anti HBc+ se estandarizó una PCR y Nested PCR, y se utilizaron primers en la PCR que reconocen

una secuencia muy conservada de la región C del genoma del VHB. Las muestras se amplificaron en distintas corridas siempre incluyendo uno o dos controles positivos internos y un control negativo con el propósito de verificar que los cebadores estaban uniéndose adecuadamente es decir a la temperatura de anidamiento correcta y que no hubiera contaminación de ninguno de los componentes de la mezcla de reacción o bien la presencia de inhibidores en la mezcla de reacción. En aquellas muestras con gran cantidad de ADN viral se observaron las bandas de la PCR, como en los controles positivos pero no necesariamente se observaron en muestras con baja cantidad de ADN viral sin embargo la ausencia de estas bandas en la PCR no indica la ausencia de ADN de virus. La PCR anidada con cebadores más específicos aumenta la sensibilidad mejorando la detección de ADN de VHB en muestras con poca cantidad de ADN. De los hallazgos observados en esta fase podemos destacar que 3 de las muestras anti HBc+/HBsAg amplificadas fueron positivas por Nested PCR. Si sumamos estas 3 muestras anti HBc+/HBsAg /HBV ADN + a las 3 ya identificadas con replicación del VHB en los análisis serológicos vemos que el porcentaje de donantes con replicación del VHB aumenta a 19.4/ (6/31). En un estudio recientemente realizado en India (Behzad Behbahani A. et al 2006) se encontró que 12.2/ de las muestras anti HBc positivas tenían ADN VHB que corresponde a 1 de cada 8 muestras aproximadamente. En este estudio se encontró ADN VHB en 1 de cada 10 muestras anti HBc+ aproximadamente lo que sugiere que la población de donantes anti HBc+ de Panamá es capaz de transmitir la infección por VHB y además es susceptible de desarrollar una patología hepática asociada a la presencia de ADN de VHB.

Algunos estudios realizados en primates han demostrado que la inoculación de pequeñas volúmenes de plasma HBV ADN + HBsAg no son infecciosas (Prince A. et al 2001) y en otros estudios en áreas endémicas como Taiwán se demostró que 2 de 11 pacientes que recibieron donaciones de sangre anti HBc+/HBsAg /HBV ADN + adquirieron VHB ADN post transfusión (Wang J T et al 2002) Aunque Panamá no parece tener altos niveles de endemidad hay varias regiones con seroprevalencias muy elevadas. Fue importante determinar la carga viral en aquellos que hubiesen sido positivos por PCR Nested porque en cada transfusión se multiplica el riesgo de adquirir la infección cientos de veces debido al volumen de hemocomponente transfundido. Sin embargo al determinar la carga viral solo uno de los anti HBc+/HBsAg+ tuvo carga viral de  $2.28 \times 10^2$  /  $2.17 \times 10^2$  (promedio 222.5 copias de ADN de VHB/ml). Las demás muestras a pesar de tener ADN de virus presente no tuvieron carga viral detectable. Aquí es importante mencionar que la PCR anidada tiene una sensibilidad mucho mayor que la del método para carga viral (10 copias vs 300 copias de ADN VHB /ml de muestra) aunque hay que tomar en consideración el tiempo que tenían las muestras de haber sido colectadas. Hubo concordancia en los resultados obtenidos en la Fase Molecular de este estudio con los de la Fase Serológica y se pudo estandarizar una metodología que puede ser utilizada en casos en que haya discrepancia o duda en el perfil serológico ya sea por la presencia de una variante de VHB por la condición inmunológica del paciente/donante o para dar seguimiento al tratamiento de la infección por VHB.

## **CONCLUSIONES**

- ✓ Este estudio evidencia la importancia de la determinación del anti HBc en el tamizaje de las unidades donadas para minimizar la infección postransfusional
- ✓ El marcador anti HBs es un marcador no rutinario que complementa el anti HBc para descartar falsos positivos y para conocer el estado inmune del donante frente al VHB
- ✓ La adición de un marcador serológico no rutinario como el anti HBs es una alternativa costo-efectiva para predecir la presencia del VHB sin llegar al análisis molecular que es más costoso
- ✓ Se confirma que la presencia de ADN del VHB sin carga viral detectable en el suero de un donante representa un riesgo de transmisión del VHB
- ✓ Este estudio confirmó una vez más, la relación que existe entre el comportamiento social de los donantes y el alto número de unidades anti HBc positivas
- ✓ Es el primer estudio que analiza las características epidemiológicas de donantes panameños
- ✓ El estudio demuestra que un alto porcentaje de los donantes no están vacunados

### RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar estudio de costo-efectividad para la introducción en los bancos de sangre del anti HBs (introducción de la prueba vs número de unidades descartadas) el cual recomendamos para un tamizaje eficiente
- ✓ Se debe fortalecer el Sistema de Vigilancia Epidemiológico con la información de donantes anti HBc+ acelerando la inclusión de los Donantes Anti HBc + en la lista de Donantes Diferidos Permanentes
- ✓ Recomendamos el mantenimiento de la vacunación en el nivel secundario de escolaridad ya que el 43.3 % de la población que dona llega hasta este nivel y el inicio de las vacunaciones en la Región de Changuinola en la población mayor de 18 años
- ✓ Incorporar el uso de equipos y metodologías de alta sensibilidad y especificidad como la quimioluminiscencia para las pruebas de VHB en los Bancos de Sangre
- ✓ Incorporar el Manejo Sugerido para el Donante anti HBc positivo de este estudio

### **ACCIONES ESPERADAS COMO RESPUESTA AL ESTUDIO**

- é Crear conciencia de la importancia de la instauración de la vacunación para el VHB entre la población sexualmente activa, en especial varones, sobretodo de baja escolaridad ya que representan la mayoría de los donantes del país**
- é Crear conciencia de que no sólo el VIH es causal de muerte y enfermedad sino que también existen enfermedades aparte de las ITS que también se pueden evitar brindando educación temprana acerca del comportamiento sexual**



## REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

- 1 Abbott Cientifica Guia de Hepatitis
- 2 Aguiar J Aguiar E Paniago A Cunha R Galvao L Daher R Prevalence of Antibodies to Hepatitis B core Antigen in Blood Donors in the Middle West Region **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz On Line** Vol 96 (2) Feb 2001
- 3 Al Mekhaizeem K Miriello M Sherker A The frequency and significance of isolated hepatitis B core antibody and the suggested management of patients **Canadian Medical Association Journal** Vol 165 (8) p 1063 1064 2001
- 4 Allain JP Reesink H Lucey Ch A European perspective on the management of donors and units testing positive for hepatitis B virus DNA. **Transfusion** Vol 46 jul 2006
- 5 Alestig E Hannoun Ch Horal P Lindh M Phylogenetic Origin of Hepatitis B Virus Strains with Precore C 1858 Variant **Journal of Clinical Microbiology** Vol 39 No 9 p 3200-3203 2001
- 6 Arraes L Ximenes R Andrieu Jean Marie et al The biological meaning of anti HBc positive result in blood donors relation to HBV DNA and to other serological markers **Rev Inst. Med trop S Paulo** Vol 45 No 3 Sao Paulo 2003
- 7 Behzad Behbahani A Mafi Nejad S Z T Lankarani K B Torab A Moaddeb A Anti HBc and HBV DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection **Indian J Med Res** 123 p 37 42 Jan 2006
- 8 Blumberg, Baruch The Discovery of the Hepatitis B virus and the invention of the vaccine A scientific memoir **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 17 S502 S503 2002
- 9 Bréchet C Polymerase chain reaction for the diagnosis of viral hepatitis B and C **Gut** supplement S39 S44 1993
- 10 Caetano MM Trevisan B S Importancia de la detección de anticuerpos anti HBc en la prevencion de la transmision del Virus de Hepatitis B (VHB) en Bancos de Sangre **Revista Brasileira de Análisis Clinicos** Vol 38 Pag 235 237 2006
- 11 Cano E Pinto J C Determinación de Distrofinopatias (Síndrome de Duchene y Becker) por medio de la Técnica de Multiplex PCR Tesis Universidad de Panama, Panamá 120 págs 2001

- 12 Clement F Dewint P Leroux Roels G Evaluation of a New Rapid Test for the Combined Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen and Hepatitis B Virus e Antigen **Journal of Clinical Microbiology** Vol 40 No 12 p 4603-4606 2002
- 13 Cortes A Beltran M Olaya B Hernandez M Riesgo de enfermedades infecciosas transmitidas por transfusion en el Valle del Cauca, Colombia **Colombia Medica** Vol 30 No 1 Pág 13-18 1999
- 14 Chan H Wong M Yui Hui A Cheung Tsui H L Chan F Sung J J Hepatitis B Virus Genotype C takes a more Aggressive Disease Course than Hepatitis B virus Genotype B in Hepatitis B e Antigen Positive Patients **Journal of Clinical Microbiology** Vol 41 No 3 Mar 2003
- 15 Chan H Wong M Yui Hui A Cheung Tsui H L Chan F Sung J J Use of Hepatitis B Virus DNA Quantitation to Predict Hepatitis B e Antigen Reversion in Cases of Chronic Hepatitis B **Journal of Clinical Microbiology** Vol 41 No 10 p 4793-4795 2003
- 16 Chaudhuri V Nanu A Panda K S Chand P Evaluation of serologic screening of blood donors in India reveals a lack of correlation between anti-HBc titer and PCR amplified HBV DNA. **Transfusion** Vol 43 Issue 10 p 1442 Oct 2003
- 17 Chen Ning Wei Oon Jin Chong Hepatitis B virus mutants **An overview** **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 17 S497-499 2002
- 18 Chu Chia Ming, Yeh Chua Ting, Lee Ching Song, Sheen I Shyan, Liaw Yun Fan Precore Stop Mutant in HBeAg Positive Patients with Chronic Hepatitis B Clinical Characteristics and Correlation with the course of HBeAg to-Anti-HBe Seroconversion **Journal of Clinical Microbiology** Vol 40 No 1 p 16-21 Enero 2002
- 19 Chu Chia Ming, Yeh Chua Ting, Lee Ching Song, Sheen I Shyan, Liaw Yun Fan  
Precore Mutant of Hepatitis B Virus Prevails in Acute and Chronic Infections in an Area in which Hepatitis B is Endemic **Journal of Clinical Microbiology** Vol 34 p 1815-1818 Jul 1996
- 20 Chu Chia Ming, Yeh Chua Ting Chien Rong Nan Sheen I Shyan, Liaw Yun Fan The Degrees of Hepatocyte Nuclear but Not Cytoplasmic Expression of Hepatitis B Core Antigen Reflect the Level of Viral Replication in Chronic Hepatitis B Virus Infection **Journal of Clinical Microbiology** Vol 35 No 1 p 102-105 Enero 1997
- 21 Chu CJ Hussain M, Lok AS Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection **Hepatology** 36(6) 1408-15 Dic 2002

- 22 Diepolder H Hoffman R Gerlach J Zachoval R Jung M Pape G  
Immunopathogenesis of HCV infection **Current Studies in Hematology and Blood Transfusion** No 62 1998
- 23 FDA Recommendations Concerning Testing for Antibody to Hepatitis B Core Antigen (Anti HBc) to All Registered Blood Establishments Sept 1991
- 24 Fertelson M Hepatitis B Virus in Hepatocarcinogenesis **Journal of Cellular Physiology** 181 188 202 1999
- 25 Gramzinski R Brazolot C Obaldia N et al Immune Response to a Hepatitis B DNA Vaccine in Aotus Monkeys A comparison of Vaccine formulation route and method of administration **Molecular Medicine** 4 109 118 1998
- 26 Gutierrez C León G Liprandi F Pujol F Bajo impacto de la infección silente por el virus de la hepatitis B en la incidencia de hepatitis postransfusional en Venezuela **Revista Panamericana de Salud Publica** Vol 10 No 6 2001
- 27 Gutiérrez, C Leon G Loureiro L Uzategui N Liprandi F Pujol F  
Hepatitis B Virus DNA in Blood Samples Positive for Antibodies to Core Antigen and Negative for Surface Antigen **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** Vol 6 No 5, p 768 770 Sept 1999
- 28 Gutierrez C Devesa Mm Loureiro CL León G Liprandi F Pujol F  
Molecular and Serological Evaluation of Surface Antigen Negative Hepatitis B Virus Infection in Blood Donors from Venezuela **Journal of Medical Virology** 73 200 207 2004
- 29 Hawkes R Boughton, C Ferguson V Lehmann N Use of Immunoglobulin M Antibody to Hepatitis B core Antigen in Diagnosis of Viral Hepatitis **Journal of Clinical Microbiology** Vol 11 No 6 p 581 583 Jun 1980
- 30 Imamura T Yokosuka O Kurihara T Kanda T Fukai K Imazeki F Saisho H  
Distribution of hepatitis B viral genotypes and mutations in the core promoter and precore regions in acute forms of liver disease in patients from Chiba, Japan **Gut** Vol 52 p 1630 1637 2003
- 31 Jongerius JM Wester M Cuypers H T M van Oostendorp W R Lelie P N  
van der Poel C L van Leeuwen E F New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays **Transfusion** Vol 38, 1998
- 32 Kaneko Sh Miller R Feinstone S Unoura M, Kobayashi K et al Detection of serum Hepatitis B Virus DNA in patients with chronic hepatitis using Polymerase Chain Reaction assay **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** Vol 86 p 312 316 1989

- 33 Kao J Chen P Lai M Chen D Clinical and Virological Aspects of Blood donors infected with Hepatitis B Virus Genotypes B and C **Journal of Clinical Microbiology** Vol 40 p 22 25 2002
- 34 Kao J Chen P Lai M Chen D Genotypes and Clinical Phenotypes of Hepatitis B Virus in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection **Journal of Clinical Microbiology** Vol 40 No 4 p 1207 1209 2002
- 35 Keefe E B Dienstag J L HBV Timely Information for Practicing Physicians **Watch** November 2003
- 36 Khalid A Al Mekhaizeem Michael Miriello Averell H Sherker The frequency and significance of isolated hepatitis B core antibody and the suggested management of patients **Canadian Medical Association Journal** Vol 8 pag 165 2001
- 37 Kessler H Stelzl E Daghofer E Santner B et al Semiautomated Quantification of Hepatitis B Virus DNA in a Routine Diagnostic Laboratory **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** Vol 7 No 5 p 853 855 2000
- 38 Kessler H Preiniger S Stelzl E Daghofer E Santner B et al Identification of Different States of Hepatitis B Virus Infection with quantitative PCR Assay **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** Vol 7 No 2 p 298 300 2000
- 39 Kessler H Pierer K Dragon E Lackner H Santner B Stunzner D et al Evaluation of a new assay for HBV DNA quantitation in patients with chronic hepatitis B **Clinical and Diagnostic Virology** Vol 9 Issue 1 p 37-43 1998
- 40 Kimura T Rokuhara A Sakamoto Y Yagi Sh Tanaka E Kiyosawa K Maki N Sensitive Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Virus Core Related Antigens and their Correlation to Virus Load **Journal of Clinical Microbiology** Vol 40 No 2 p 439-445 2002
- 41 Kimura T Rokuhara A Matsumoto A Yagi Sh Tanaka Eiji Kiyosawa K Maki N New Enzyme Immunoassay for Detection of Hepatitis B Virus Core Antigen (HBcAg) and Relation Between levels of HBcAg and HBV DNA **Journal of Clinical Microbiology** Vol 41 p 1901 1906 2003
- 42 Kuhns MC Kleinman SH McNamara AL Rawal B et al Lacks of correlation between HBsAg and HBV DNA level in blood donors who test positive for HBsAg and anti HBc implications future HBV screening policy **Transfusion** Vol 44 Issue 9 P 1332 Sept 2004
- 43 Kurt W Weber M Petersen D et al NAT for HBV and anti HBc testing increase blood safety **Transfusion** Vol 42 Issue 7 p 869 Julio 2002

- 44 Lanford R. Chavez D Brasky K Burns R Rico Hesse R Isolation of a hepadnavirus from the wooly monkey a New World primate **Proceedings of National Academy of Science** Vol 95 pág 5757 5761 may 1998
- 45 Liang T J Isselbacher K J Wands J R Rapid Identification of low level hepatitis B related viral genome in serum **The Journal of Clinical Investigation** 84 (4) pág 1367 1371 oct 1989
- 46 Long J Allwright S Barry J *et al* Prevalence of antibodies to hepatitis B hepatitis C and HIV and risk factors in entrants to Irish prisons a national cross sectional survey **Britannic Medical Journal** Vol. 323 p 1 6 nov 2001
- 47 Marin I Poljak M Seme K *et al* Comparative Evaluation of Semiautomated COBAS AMPLICOR Hepatitis B Virus (HBV) MONITOR Test and Manual Microwell Plate Based AMPLICOR HBV MONITOR Test **Journal of Clinical Microbiology** Vol 39 No 2 p 758 761 Febrero 2001
- 48 Matsumoto Ch Tadokoro K Fujimura K *Et al* Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository **Transfusion** Vol 41 Issue 7 p 878 Julio 2001
- 49 Milich D Liang J Exploring the Biological Basis of Hepatitis B e Antigen in Hepatitis B Virus Infection **Hepatology** Vol 38, No 5 2003
- 50 Moerman B Moons V Sommer H Schmitt Y Stetten S Evaluación de la sensibilidad de las formas silvestres y mutantes del antígeno de superficie de la hepatitis B mediante cuatro ensayos comerciales de HBsAg **Clin Lab** 50 2004
- 51 Moore Ch John B Hewitt P Anti HBc in Blood Donors **Vox Sanguinis** Vol 74 3209 1998
- 52 Noborg U Gusdal A Pisa E Hedrum A Lindh M Automated Quantitative Analysis of Hepatitis B virus DNA by using the Cobas Amplicor HBV Monitor Test **Journal of Clinical Microbiology** Vol 37 p 2793 2797 sept 1999
- 53 Okamoto H, Tsuda F Sakugawa H *et al* Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence comparison of surface antigen subtypes **Journal Gen Virol**, 69 2575 83 1988
- 54 Ortiz R Alba, Martinez C Alexander A Genotipaje del Virus de la Hepatitis B en Población China residente en el área metropolitana de Panama, año 2007 **Tesis de Pregrado** Universidad de Panama, Facultad de Medicina, 2007
- 55 Prince A M Lee DH Brotman B Infectivity of blood from PCR positive HBsAg negative anti HBs positive cases of resolved hepatitis B infection **Transfusion** Vol 41 Issue 3 p 329 Mar 2001

- 56 Prout Matias K Estudios de los orígenes virales de algunos cánceres conducen a nuevas estrategias de prevención y tratamiento **Onco Log** Vol 49 No 1 enero 2004
- 57 Reherrmann B Nascimbeni M Immunology of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus infection **Nature Reviews Immunology** Vol 5 No 3 p 215 229 marzo 2005
- 58 Robins GW Scott LJ Keating GM Peginterferon alpha 2a (40kD) A review of its use in the management of patients with Chronic Hepatitis B **Drugs** Vol 65 No 6 809 25 2005
- 59 Roth W K Weber M Petersen D Drosten Ch Buhr S Sireis W Weichert W Hedges D Seifried E NAT for HBV and anti HBc testing increase blood safety **Transfusion** Vol 42 Issue 7 P 869 jul 2002
- 60 Sampieri R Collado C Lucio P **Metodología de la Investigación** Segunda Edición P 211 212 2000
- 61 Schochetman GG Gerlich WH Kuhns MC Symposium on HIV variants and hepatitis B surface antigen mutants (conference summary) **Emerging Infectious Diseases** Oct 2005
- 62 Szmunes W Hoofnagle JH Stevens CE Prince AM Antibody against the hepatitis type B core antigen A new tool for epidemiological studies **American Journal of Epidemiology** Vol 104 Issue 3 p 256 262 1976
- 63 Tabor E Hoofnagle JH Barrer LF Pineda Tamondong G Nath N Smallwood LA Gerety RJ Antibody to hepatitis B core antigen in blood donors with a history of hepatitis **Transfusion** Vol 21 Issue 3 p 366 May 1981
- 64 Takahashi M Nishizawa T Gotanda Y Tsuda F Komatsu F et al High Prevalence of antibodies to Hepatitis A and E Viruses and Viremia of Hepatitis B C and D Viruses among apparently Healthy populations in Mongolia **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** Vol 11 No 2 p 392 398 marzo 2004
- 65 Thimme R Wieland S Steiger C Ghayeb J Reimann K Purcell R Chisari F CD8 T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection **Journal of Virology** Vol 77 No 1 p 68 76 enero 2003
- 66 Tsuda Sh Yoshioka K Tanaka T Iwata A Yoshikawa A Watanabe Y Okada Y Application of the Human Hepatitis B virus core antigen from transgenic tobacco plants for Serological Diagnosis **Vox Sanguinis** Vol 74 Pag 148 1988

- 67 Tsutsumi Y Kakumu S Wakita T Yoshioka K Ishikawa T In vitro production of antibody to hepatitis B core and E antigens by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B virus infection **The Journal of Immunology** Vol 144 Issue 6 p 2389 2393 1990
- 68 Turchi Martelli CM Turchi MD Dutra Souto FJ Saéz Alquézar A Andrade AL Zicker F Anti HBc testing for blood donations in areas with intermediate hepatitis B endemicity **Revista Panamericana de Salud Publica** Vol 6 No 1 Washington Jul 1999
- 69 Yotsuyanagi H Yasuda K Moriya K Shintani Y et al Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg –negative anti HBc-positive blood donors **Transfusion** Vol 41 Issue 9 p 1093 Sept 2001
- 70 Yuen Man Fung Fung S Tanaka Y Kato T Mizokami M Yuen John Chi Hang, Wong D Yuan He Jun Sum Siu Man, Chan A Wong B Lai Ch Longitudinal Study of Hepatitis Activity and Viral Replication before and after HBeAg Seroconversion in Chronic Hepatitis B Patients Infected with Genotypes B and C **Journal of Clinical Microbiology** P 5036 5040 Nov 2004
- 71 Wang J T Lee C Z Chen P J Wang T H, Chen D S Transfusion transmitted HBV infection in an endemic area the necessity of more sensitive screening for HBV carriers **Transfusion** Vol 42 Issue 12 p 1592 Dic 2002
- 72 Wong DKH Yuen MFY Tse E Yuan HJ Sum SSM Hui ChKH Lung Lai Ch Detection of Intrahepatic Hepatitis B Virus DNA and Correlation with Hepatic Necroinflammation and Fibrosis **Journal of Clinical Microbiology** Vol 42 No 9 p 3920 3924 Sept 2004
- 73 [www.abcmedicus.com](http://www.abcmedicus.com) Antivirales e inmunomodulares en hepatitis por virus B y C
- 74 [www.aafp.org](http://www.aafp.org) Lin K Kirchner J Hepatitis B **American Family Physician** Cover article Enero 2004
- 75 [www.cdc.gov/spanish/enfermedades/Hepatitis.htm](http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/Hepatitis.htm) CDC Home Page Search for Viral Hepatitis B
- 76 [www.karger.com](http://www.karger.com) Diagnostic Problems caused by HbsAg Mutants A consensus report of an expert meeting **Intervirolgy** 47 310 313 2004
- 77 [www.roche.es/noticias/](http://www.roche.es/noticias/) Pegasys autorizado en Suiza para la hepatitis B crónica
- 78 [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) What is the clinical impact of occult hepatitis B virus infection? Vol 365 Febrero 19 2005

- 79 [www.seimc.org/revi\\_Sero/Rvirhbs.htm](http://www.seimc.org/revi_Sero/Rvirhbs.htm) Alcaraz M J Virus de la Hepatitis B Estructura genómica y marcadores clínicos
- 80 [www.sicusalud.com](http://www.sicusalud.com) Monsalve M F Romero T Estévez M J Citocinas su papel en la infección por el Virus de la Hepatitis B Nov 2004
- 81 Zaaijer HL Borg F ter Cuyper HT Hermus MC Lelie PN Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. **Journal of Clinical Microbiology** Vol 32 p 2088 2091 Sept 1994
- 82 Zervou E Dalekos G Boumba D et al Value of anti HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection results of 3 year prospective study in Northwestern Greece **Transfusion** Vol. 41 Issue 5 p 652 May 2001
- 83 Zoulim F Mimms L Fioreanu M Pichoud C Chemin I Kay A et al New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection **Journal of Clinical Microbiology** Vol 30 No 5 p 1111 1119 May 1992



# **ANEXOS**

**Anexo No. 1**  
**Imágenes del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía**



Foto #1. Fachada del Hospital José Domingo de Obaldía, las nuevas instalaciones se inauguraron en el año 2004 durante la gestión de la Presidenta Mireya Moscoso.

Foto #1.

Foto #2. Camas para  
recepción.  
El área de donación está  
separada del área de  
realización de pruebas.



Foto #2.



Foto #3 Equipo Axsym de  
metodología MEIA, se usa para  
realizar las pruebas serológicas  
en el Banco de Sangre.

Foto #3

**Anexo No. 2**  
**Imágenes del Hospital Regional Rafael Hernández**



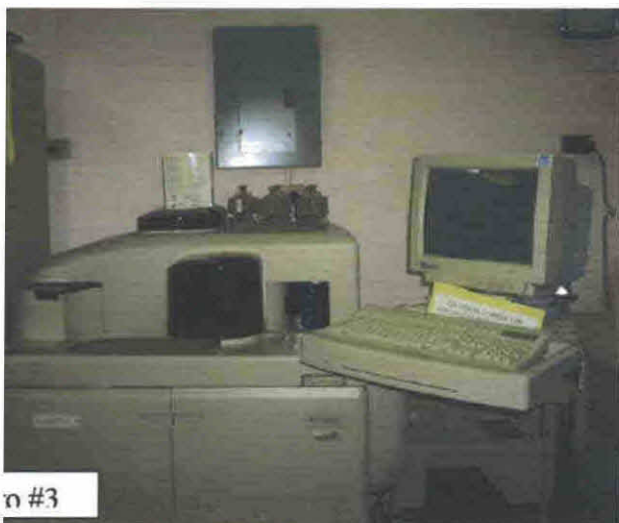
**Foto #1.**

Foto #1. Fachada del Hospital Rafael Hernández, este hospital es dependencia de la CSS. No ha tenido remodelaciones en los últimos años.

Foto #2. Área de Donación. Está separada del área de pruebas, sin embargo el espacio no es suficiente para ofrecer un buen servicio.



**Foto #2.**



**Foto #3.**

Foto #3. Equipo Vitros Eci, se utiliza para realizar las pruebas serológicas de los donantes.

**Anexo No. 3**  
**Imágenes del Hospital de Changuinola**



Foto #1. Área de donaciones. Obsérvese el tamaño reducido, hay una sola cama de donación, no hay divisiones entre el área de donación y el área de pruebas.

El hecho de que haya una sola cama no permite que el donante repose un tiempo antes de levantarse.

**Foto #1.**

1 Tecnóloga  
Médica

1  
Asistente

Donante



Foto #2. Entrada al Banco de Sangre del Hospital de Changuinola. Obsérvese las condiciones de paredes y techo.

**Foto #2.**

#### Anexo No.4

#### Equipo Vitros Eci del ICGES-LCRSP



Reactivo del Equipo Vitros Eci.



INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS/ LABORATORIO CENTRAL DE REFERENCIA EN SALUD PÚBLICA  
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de este consentimiento le invitamos a participar de la investigación titulada

Detección de portadores crónicos activos del virus de la hepatitis B mediante la detección del HBsAg, otros marcadores serológicos, HBV DNA y evaluación de su respuesta inmune midiendo IFN-γ en una muestra de donantes anti HBc- y anti HBe- de Panamá, año 2005.

BREVE RESUMEN y PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN

El virus de la Hepatitis B (VHB) es el agente causal de la hepatitis B enfermedad que genera severos daños a nivel hepático y que puede ser adquirida mediante la transfusión de sangre y hemoderivados de donantes que tengan el virus así como también por transmisión sexual.

La prevención de ésta y otras enfermedades transmitidas por transfusión es uno de los objetivos primordiales de la práctica actual en la medicina transfusional. Para cumplir con este objetivo se realizan pruebas de tamizaje en busca de anticuerpos específicos contra el VHB.

En este trabajo se pretende determinar la presencia de otros marcadores serológicos como el HBsAg (antígeno e del VHB el cual está presente durante la replicación activa del virus) anti HBs (anticuerpos contra el Antígeno de superficie presente en los donantes y pacientes vacunados contra el VHB y en aquellos que han tenido contacto con el virus) y anti-Hbe (anticuerpos contra el antígeno e del VHB presente en los donantes y pacientes que han pasado la infección y que tienen pocas probabilidades de desarrollar patología posterior a la infección) además se detectará la presencia de HBV DNA y los niveles de citoquinas inflamatorias como el IFN-γ en donantes anti HBc core positivos.

*La presencia de anticuerpos contra el core de hepatitis B (anti HB core+) indica la posibilidad de haber estado en contacto con el VHB ya que el core es parte de los componentes del virus.*

*Al estar presentes estos anticuerpos la unidad de sangre donada debe ser descartada lo que anula la posibilidad de utilizar a su vez cualquiera de sus derivados (plaquetas, glóbulos rojos, plasma, etc.).*

La detección de otros marcadores aparte del anti-HBc brindará una idea más amplia acerca del número de donantes portadores asintomáticos quienes son agentes de transmisión del VHB.

Los métodos y procedimientos para la obtención de resultados serán los que indiquen las diferentes pruebas comerciales: ELISA (enzimo-inmunoensayo) de tercera generación y PCR ELISA de COBAS AMPLICOR HBV Monitor Test (prueba para detectar DNA del virus de Hepatitis B circulante).

Propósito de la Investigación

En el último año 2004 un significativo porcentaje de donantes han resultado anti HB-core positivos y la mayoría no tienen el conocimiento de haber estado en contacto o haber tenido Hepatitis B. Sin embargo una de las posibilidades de que este resultado sea positivo es que se trate de un *falso positivo*. De ahí la importancia de determinar otros marcadores que indiquen con mayor certeza la presencia del VHB y conociendo esta condición en el donante poder remitir una información más completa al Sistema de Vigilancia Epidemiológica y éste a su vez la hará de conocimiento del médico a fin de poder dirigir un mejor tratamiento y educación al donante.

PROCEDIMIENTO

Cuando Ud. llegue al Banco de Sangre a donar se le entregará El consentimiento informado junto con un formulario de recolección de datos el cual usted llenará sin ninguna obligación. Se le tomará un tubo de sangre adicional en el momento de la donación para ser enviada al Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública donde se realizarán las pruebas de laboratorio por tecnólogos médicos idóneos. Esta muestra sólo va a ser utilizada para el propósito de esta investigación.

Usted recibirá los resultados de las pruebas para Hepatitis B por escrito y en caso de que salgan positivos será referido a un médico especialista si su resultado lo amerita.

RIESGOS PARA EL SUJETO

No existe ninguno adicional a los riesgos normales relacionados con la donación de sangre. Puede haber dolor y una ligera irritación en el sitio de la punción (formación de hematoma).

BENEFICIOS POTENCIALES

1. Usted recibirá los resultados de las pruebas de laboratorio por escrito.
2. Su resultado aportará información valiosa al Sistema de Vigilancia Epidemiológica.
3. Recibirá asistencia médica y orientación de acuerdo a su resultado.

CONFIDENCIALIDAD

Los resultados serán publicados respetando la identidad de cada uno de los participantes de este estudio, sólo se publicarán cifras, no nombres.

PARTICIPACIÓN

Su participación NO es obligatoria.

Si usted no desea participar no se le negará su derecho a atención.

Si desea participar tomaremos 10 minutos de su tiempo para tomar una serie de datos.

Deseo participar en el estudio. Sí ☐ No ☐

Firma de Consentimiento, \_\_\_\_\_ ← Firma del Testigo, \_\_\_\_\_  
Fecha \_\_\_\_\_

# Anexo No 7

## FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### Datos Personales,

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ No de Donante \_\_\_\_\_

Ocupación \_\_\_\_\_ Nivel Escolar \_\_\_\_\_

Estado Civil \_\_\_\_\_

### Residencia

Corregimiento \_\_\_\_\_

Barriada \_\_\_\_\_

### Tipo de donación

Voluntaria ☐ Reposición ☐

### Hábitos Sexuales

Heterosexual ☐ Homosexual ☐

Tiene más de una pareja habitual? Sí ☐ No ☐

### Medicamento de uso frecuente

\_\_\_\_\_

### Padecimiento

Ninguno ☐ Presión Alta ☐ Diabetes ☐

Otro \_\_\_\_\_

Ha presentado alguna vez un episodio de ictericia? (¿ha puesto amarillito?)

Sí ☐ No ☐

### Consumo de alcohol frecuentemente?

Sí ☐ No ☐ Cuántas veces por semana \_\_\_\_\_

### Se ha colocado la vacuna para la Hepatitis B.

Sí ☐ No ☐

Número de dosis \_\_\_\_\_

Ha tenido síntomas de resfriado en los últimos 2 meses

Sí ☐ No ☐

Instituciones que apoyan este estudio, U. De Pí, ICGES/ LCRSP, B.S. CHMAAM, B.S. HST, B.S. H. p. Rafael Hernández, B.S. Hosp. Mat-Inf. José D. De Obaldia, B.S. Changinola, B.S. Hosp. Manuel A. Guerrero, MINSA.

### ESTA INFORMACIÓN ES Estrictamente CONFIDENCIAL

A quién contactar: Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio puede contactar Lic. Elianne Cano investigadora principal en el Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública T 1 212-9407 Fax 212-9567

Nota: Las copias firmadas de esta hoja de consentimiento deberá distribuirse así:

1. Entrega copia a cada participante
2. Enviarle el formulario de recolección de datos completo al investigador junto con las muestras
3. Enviar una copia firmada del consentimiento al investigador

Nombre del Banco de Sangre \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
No de Donante \_\_\_\_\_ Iniciales del Donante \_\_\_\_\_

Anti-HBcore	Interpretación	Método	Valor de corte/rata

HBsAg	Interpretación	Método	Valor de corte/rata

Tecnólogo que realiza la prueba \_\_\_\_\_

**Tabla 3. Reactivos Necesarios para el Equipo Virus HCV en la Fase Serológica del Estudio**

Nombre del Reactivo	Descripción de su Uso	No. De Pruebas	Cantidad de Muestra requerida	Cálculo de Resultados
Diluyente de Muestra B (Sample Diluent B)	Se realiza en la dilución automatizada de muestras con valores superiores al intervalo de calibración.	100 Pruebas	Depende de la dilución	Se multiplica 1 valor obtenido por el factor de dilución.
Reactivo de Señal (Signal Reagent B)	Genera 1 señal luminiscente en 1 Sistema de Inmunodiagnóstico Viro.	210 Pruebas		
<p>Empaque de Reactivo para Anti-HBeore (Anti-HBeore Reagent Pack)</p> <p>&gt; Calibrador de Reactivo (del mismo lote)</p> <p>&gt; Caja con 3 pares de controles de 0.5ml (anti-HBeore y anti-HBeore (-)) (del mismo lote)</p>	<p>Para la detección cualitativa in vitro de anticuerpos frente al antígeno core de 1 hepatitis B en suero y plasma humano (EDTA, heparina citrato). Se requiere calibrar 1 equipo con el Calibrador del mismo lote del reactivo antes de su uso.</p>	100 Pruebas	50ml	<p>Señal de la muestra en ensayo</p> <p>Valor de Corte</p> <p>Resultados</p> <p>&lt;1.0 = muestra reactiva</p> <p>Muestra &gt; 1.20 = muestra no reactiva</p> <p>Muestras 1.00 y &lt;1.20 indican una muestra dudosa.</p>
<p>Empaque de Reactivo para Anti-HBs (Anti-HBs Reagent Pack)</p> <p>&gt; Calibradores de 3 niveles de concentración de anticuerpos</p> <p>&gt; Caja con 3 pares de controles</p>	<p>Para la detección cualitativa in vitro de anticuerpos frente al antígeno de superficie de la hepatitis B en suero y plasma humano (EDTA, heparina citrato). Se requiere calibrar 1 equipo con 1 Calibrador del mismo lote del reactivo antes de su uso.</p>	100 Pruebas	80 ml	<p>Valores <math>\geq 12</math> mU/ml – Anticuerpo Positivo</p> <p>Valores 8-12 mU/ml Dudoso</p> <p>Valores &lt;8 mU Negativo</p>
<p>5 Empaque de Reactivo para Anti-HBe (Anti-HBe Reagent Pack)</p> <p>&gt; Calibrador de Reactivo (del mismo lote)</p> <p>&gt; Controles HBe (control 3)</p>	<p>Para la detección cualitativa in vitro de anticuerpos frente al antígeno de la hepatitis B en suero y plasma humano (EDTA, heparina citrato). Se requiere calibrar 1 equipo con 1 Calibrador del mismo lote del reactivo antes de su uso.</p>	50 Pruebas	80 ml	<p>Valor de corte</p> <p>Señal de la muestra en ensayo</p> <p>Resultados</p> <p>&lt;0.80 = muestra no reactiva</p> <p>Muestra <math>\geq 1.20</math> = muestra reactiva</p> <p>Muestras &gt;0.80 y 1.20 indican una muestra dudosa.</p>
<p>Empaque de Reactivo para HBeAg (HBeAg Reagent Pack)</p> <p>&gt; Calibrador de Reactivo (del mismo lote)</p> <p>&gt; Controles HBe (controles 1 y 2)</p>	<p>Para la detección cualitativa in vitro del antígeno de la hepatitis B (HBeAg) en 1 suero humano</p>	50 Pruebas	80ml	<p>Señal de la muestra en ensayo</p> <p>Resultados</p> <p>&lt;0.80 = muestra no reactiva</p> <p>Muestra 1.20 = muestra reactiva</p> <p>Muestras &gt;0.80 y &lt;1.20 indican una muestra dudosa.</p>
<p>Empaque de Reactivo para HBsAg (HBsAg Reagent Pack)</p> <p>&gt; Calibrador de Reactivo (del mismo lote)</p> <p>&gt; Controles HBsAg</p>	<p>Para la detección cualitativa in vitro del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en 1 suero humano</p>	100 Pruebas	80 ml	<p>Valor de corte</p> <p>Señal de la muestra en ensayo</p> <p>Muestra <math>\geq 1.00</math> = muestra reactiva.</p>



# Anexo No 9 Resumen de Información Obtenida Mediante el Formulario de Recolección de Datos en el Banco de Sangre del Hospital Rafael Hernández

Banco de Sangre entrega	Número de entrega	Sexo	edad	Ocupación	Nivel educ.	Estado civil	Residencia	Tipo de donación valorar reposición	Hábito residual	Más de una parceja residual	Incidencia menor	Presencia no	Episodio de leucemia	consumo de alcohol frecuente	Vacuna para Hepatitis B				Bacterias del residual en hepatitis B 2 meses	
															1	2	3	4		
1	Rafael Hernández 05-08 0	1	51	abuelo	analfabeto	soltero	Los Aguileros	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
2	Rafael Hernández 05-8 1	1	36	ayudante gral	tercer año	unido	Las Lomas	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
3	Rafael Hernández 05-8 2	1	43	ayudante gral	secundaria	unido	Los Aguileros	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
4	Rafael Hernández 05-8 3	1	33	ayudante gral	primaria	soltero	Los Aguileros	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
5	Rafael Hernández 05-8 4	0	2	agente	tercer año	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
6	Rafael Hernández 05-8 5	0	43	carpintero	secundaria	casado	boqueron	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
7	Rafael Hernández 05-8 6	1	31	seminarista	universitario	casado	publica	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
8	Rafael Hernández 05-8 7	0	40	oficial	secundaria	separado	boqueron	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
9	Rafael Hernández 05-8 8	0	27	abuelo	universitario	casado	boqueron	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
10	Rafael Hernández 05-8 9	0	20	estudiante	secundaria	casado	boqueron	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
11	Rafael Hernández 05-9 0	0	28	ama de casa	secundaria	casado	pedregal	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
12	Rafael Hernández 05-9 1	0	40	pedregal	primaria	casado	pedregal	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
13	Rafael Hernández 05-9 2	1	55	agente	secundaria	casado	pedregal	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
14	Rafael Hernández 05-9 3	1	28	mesero	universitario	casado	san Félix	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
15	Rafael Hernández 05-9 4	1	35	ayudante gral	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
16	Rafael Hernández 05-9 5	1	27	ayudante gral	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
17	Rafael Hernández 05-9 6	1	44	mesero	universitario	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
18	Rafael Hernández 05-9 7	0	20	transportista	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
19	Rafael Hernández 05-9 8	0	26	transportista	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
20	Rafael Hernández 05-9 9	1	38	agente de seg	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
21	Rafael Hernández 05-0 0	1	35	agente de seg	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
22	Rafael Hernández 05-0 1	0	32	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
23	Rafael Hernández 05-0 2	1	32	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
24	Rafael Hernández 05-0 3	0	32	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
25	Rafael Hernández 05-0 4	1	43	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
26	Rafael Hernández 05-0 5	0	52	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
27	Rafael Hernández 05-0 6	0	34	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
28	Rafael Hernández 05-0 7	1	34	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
29	Rafael Hernández 05-0 8	1	25	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
30	Rafael Hernández 05-0 9	1	23	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
31	Rafael Hernández 05-1 0	0	45	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
32	Rafael Hernández 05-1 1	0	43	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
33	Rafael Hernández 05-1 2	0	40	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
34	Rafael Hernández 05-1 3	0	40	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
35	Rafael Hernández 05-1 4	0	41	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
36	Rafael Hernández 05-1 5	0	61	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
37	Rafael Hernández 05-1 6	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
38	Rafael Hernández 05-1 7	0	27	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
39	Rafael Hernández 05-1 8	0	34	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
40	Rafael Hernández 05-1 9	0	38	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
41	Rafael Hernández 05-2 0	0	42	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
42	Rafael Hernández 05-2 1	1	30	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
43	Rafael Hernández 05-2 2	0	30	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
44	Rafael Hernández 05-2 3	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
45	Rafael Hernández 05-2 4	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
46	Rafael Hernández 05-2 5	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
47	Rafael Hernández 05-2 6	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
48	Rafael Hernández 05-2 7	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
49	Rafael Hernández 05-2 8	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo
50	Rafael Hernández 05-2 9	0	37	conductor	secundaria	casado	delegado	no	no	ninguno	ninguno	no	no	no					no	Negativo

## Anexo No 10

Resumen de Información Obtenida Mediante el Formulario de Recolección de Datos en el Banco de Sangre del Hospital José Domingo de Obaldía

Banco de Sangre	Número de entrevista	Sexo	Ocupación	Nivel escolar	Estado civil	Residencia	Tipo de vivienda	Habitus	Ido de una pareja	Indicador de embarazo	Episodio de aborto	ceramio de alcohol	Yemas para hepatitis	Estadío de infección en los últimos meses	Resultado de hepatitis B
masculino															
José de Obaldía 2	0	26	agricultor	primaria	unido	cerca de escuela	paternal	heterosocial	no	resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 3	0	34	trb. Estrella	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José de Obaldía 5	0	29	estudiante	universitario	unido	Las Lomas	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 6	0	22	trb. laboral	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José de Obaldía 8	0	27	primario	trav. aho	casado	programa Barrio Limpio	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 8	0	33	ama de casa	primaria	unido	Cementerio Barrio Limpio	paternal	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 9	0	36	repartidor	secundaria	casado	paternal	paternal	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 9	0	32	carretero	secundaria	casado	paternal	paternal	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 9	0	32	yudat. gra	primaria	unido	cerca de escuela	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 2	0	36	construcción	primaria	unido	Las Lomas	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 3	0	30	primario	primaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 5	0	26	agricultor	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 6	0	29	serv. Público	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 7	0	27	agente de cargo	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 8	0	32	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 8	0	32	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 20	0	23	agricultor	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 21	0	23	agricultor	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 21	0	23	agricultor	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 22	0	27	proble	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 23	0	32	transportista	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 24	0	25	agricultor	primaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 26	0	29	ama de casa	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 26	0	29	ama de casa	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 27	0	26	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 27	0	26	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 28	0	29	carretero	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 28	0	29	carretero	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 29	0	36	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 30	0	36	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 32	0	46	estudiante	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 33	0	36	ama de casa	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 34	0	33	estudiante	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 34	0	33	estudiante	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 36	0	20	estudiante	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 36	0	20	estudiante	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 37	0	42	proble	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 38	0	20	estudiante	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 39	0	20	estudiante	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 40	0	36	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 40	0	36	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 42	0	36	abail	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 43	0	33	ama de casa	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 44	0	36	trabaja	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 45	0	36	ama de casa	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 46	0	29	construcción	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 48	0	36	construcción	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo
José D de Obaldía 50	0	36	construcción	secundaria	casado	divid	divid	heterosocial	no	sin resp	ninguno	no	no	no	Negativo

Resumen de Información Obtenida Mediante el Formulario de Recolección de Datos en el Banco de Sangre del Hospital de Changquínola

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

## Resumen de Información Obtenida Mediante el Formulario de Recolección de Datos en el Banco de Sangre del Hospital de Changuinola

		Sexo		edad	Ocupación	Nivel escolar	Estado civil	Residencia	Tipo de donación	Habitos sexuales	Más de una pareja habitual	Indicador de riesgo	Episodio de ictericia	consumo de alcohol frecuente	Vacuna para Hepatitis B				Síntomas del resfriado en los últimos 2 meses	Resultado de Hepatitis B core
Banco de Sangre	Número de entrada	M	F						voluntaria	repositiva					1	2	3	n		
66 CHANGUINOLA	05-775	1	0	32	jornalero	secundaria	unido	stancia, Costa Rica	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
67 CHANGUINOLA	05-776	1	0	39	transportista	universitario	soltero	fina 6	NR	NR	heterossexual	tr	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
68 CHANGUINOLA	05-777	1	0	43	inspector	secundaria	casado	bocas islas	NR	NR	heterossexual	tr	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
69 CHANGUINOLA	05-778	1	0	25	jornalero	primaria	unido	colón	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
70 CHANGUINOLA	05-779	1	0	47	superior	secundaria	casado	sucite 4	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
71 CHANGUINOLA	05-780	1	0	49	albanil	secundaria	unido	fca 12 El Puré	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
72 CHANGUINOLA	05-781	1	0	44	turnigador	primaria	casado	bocas islas	NR	NR	heterossexual	NR	ninguno	no	no	1	1	1	si	negativo
73 CHANGUINOLA	05-785	1	0	47	chófer	primaria	casado	fca 62	NR	NR	heterossexual	NR	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
74 CHANGUINOLA	05-786	1	0	42	jornalero	primaria	unido	partenel	tr	NR	heterossexual	NR	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
75 CHANGUINOLA	05-789	1	0	tr	jornalero	secundaria	soltero	changuinola	NR	NR	heterossexual	NR	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
76 CHANGUINOLA	05-790	1	0	43	policia	secundaria	unido	fca 6	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	si	negativo
77 CHANGUINOLA	05-791	1	0	47	vecedor	universitario	casado	cuadrante baselme	NR	NR	heterossexual	NR	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
78 CHANGUINOLA	05-792	1	0	43	operador	universitario	unido	fca 12	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
79 CHANGUINOLA	05-793	1	0	37	vecedor	secundaria	unido	vila carolina	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	si	negativo
80 CHANGUINOLA	05-794	1	0	31	jornalero	primaria	casado	fca 63	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
81 CHANGUINOLA	05-795	1	0	62	agricultor	analitabeta	unido	canquintu	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
82 CHANGUINOLA	05-796	1	0	30	policia	secundaria	unido	luzón	NR	NR	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	si	negativo
83 CHANGUINOLA	05-797	1	0	29	desempleado	primaria	unido	cusapil, Río Cafia	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
84 CHANGUINOLA	05-798	1	0	22	jornalero	secundaria	unido	fca 66	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
85 CHANGUINOLA	05-802	1	0	24	seguridad	técnico	soltero	I empalme Lincoln Creek	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	si	1	1	1	no	positivo
86 CHANGUINOLA	05-803	1	0	41	agricultor	secundaria	casado	crisanola, rio manell	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
87 CHANGUINOLA	05-806	1	0	32	maestro	secundaria	unido	changuinola	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
88 CHANGUINOLA	05-809	1	0	43	agricultor	primaria	unido	el empalme	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
89 CHANGUINOLA	05-811	1	0	36	jornalero	secundaria	casado	fca 62	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
90 CHANGUINOLA	05-812	1	0	34	phlor	primaria	unido	san puente	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
91 CHANGUINOLA	05-813	1	0	23	albanil	secundaria	soltero	el silencio	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	positivo
92 CHANGUINOLA	05-814	1	0	tr	jornalero	secundaria	soltero	coltala	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
93 CHANGUINOLA	05-815	1	0	26	carpintero	universitario	casado	partenel	1	0	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
94 CHANGUINOLA	05-816	1	0	26	jornalero	primaria	unido	fca 64	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo
95 CHANGUINOLA	05-817	1	0	tr	jornalero	primaria	casado	la mesa	1	1	heterossexual	no	ninguno	no	no	1	1	1	no	negativo

	Número de entrevista	Sexo	Edad	Ocupación	Nivel escolar	Estado civil	Residencia	Tipo de domicilio	Habitación personal	Método de una pareja	Método de inicio	Presencia de R0	Episodio de fiebre	contacto de sexual reciente	veas por			examen de reactiva en su casa	Resultado de Hepatitis B core
															1	2	3		
Banco de Sangre																			
		M	F					valores en mmHg								1	2	3	
CHINA	08-649	0	0	31	dominero	secundari	unido	Puerto Pílan	0	Heterosexual	N	ninguno	no	no	no				Negativo
CHINA	08-1850	0	0	45	electricista	NR	unido	Puerto Pílan	0	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no				Negativo
CHINA	08-1851	0	0	24	desempleado	secundari	soltero	Barru Vista	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no			1	Negativo
CHINA	08-1852	0	0	28	operador	universitario	unido	Chetshel	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1853	0	0	32	seguridad	secundaria	unido	Chetshel	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1857	0	0	NR	policia	secundaria	unido	Chetshel	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1860	0	0	50	seguridad	secundaria	casado	Chetshel	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1861	0	0	NR	maestro	NR	unido	Salmarcas	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-683	0	0	30	maestro	universitario	unido	Salmarcas	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1864	1	0	25	policia	secundaria	casado	Barru Sar	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1865	1	0	NR	desempleado	secundaria	soltero	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1866	1	0	33	seguridad	universitario	unido	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no			1	Negativo
CHINA	08-887	1	0	56	adell	primaria	unido	Salmarcas	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1868	1	0	38	Barru Sar	universitario	casado	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-870	1	0	45	electricista	secundaria	casado	Barru Vista	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-871	1	0	37	dependiente	NR	unido	Barru Vista	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-872	1	0	24	estudiante	secundaria	unido	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-873	1	0	30	estudiante	secundaria	unido	Barru Sar	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-874	1	0	28	estudiante	secundaria	unido	Nueva Providencia	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-875	0	0	38	estudiante	secundaria	unido	Barru Sar	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-876	0	0	25	conductor	universitario	casado	Barru Sar	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-877	1	0	25	conductor	secundaria	casado	Barru Sar	0	Heterosexual	R	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1878	1	0	25	conductor	secundaria	casado	Barru Sar	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1880	1	0	26	conductor	secundaria	casado	Barru Sar	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1881	1	0	4	trabajador manual	primaria	casado	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no			1	Negativo
CHINA	08-1882	1	0	36	chicista	secundaria	casado	Barru Norte	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1883	0	0	42	trabajador manual	secundaria	casado	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1884	0	0	52	trabajador manual	secundaria	casado	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-885	0	0	39	maestro	universitario	casado	La Barrera	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-886	0	0	54	trabajador manual	primaria	casado	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-887	1	0	54	trabajador manual	secundaria	casado	Barru Sar	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no			1	Negativo
CHINA	08-891	1	0	21	seguridad	secundaria	unido	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1903	1	0	0	seguridad	secundaria	unido	Barru Sar	0	NR	no	ninguno	no	no	no				Negativo
CHINA	08-804	1	0	0	seguridad	secundaria	casado	Barru Sar	0	NR	R	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-805	1	0	45	partiro	universitario	casado	Barru Sar	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-806	1	0	32	chicista	secundaria	casado	Archi	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-810	0	0	25	maestro	secundaria	unido	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no			1	Negativo
CHINA	08-811	0	0	25	estudiante	secundaria	casado	Salmarcas	0	NR	ninguno	ninguno	no	no	no				Negativo
CHINA	08-1812	0	0	28	Barru Sar	unido	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no			1	Negativo
CHINA	08-1813	0	0	NR	construcción	NR	casado	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1835	0	0	30	construcción	NR	unido	Puerto Pílan	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no			1	Negativo
CHINA	08-1837	0	0	30	Barru Sar	unido	Chetshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no				Negativo
CHINA	08-1838	1	0	24	equilibrio	universitario	casado	Unión	0	NR	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-829	1	0	46	maestro	NR	casado	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1940	0	0	24	construcción	secundaria	unido	Puerto Pílan	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1941	1	0	25	construcción	Barru Sar	unido	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1942	0	0	16	construcción	NR	unido	Catshel	0	NR	R	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-943	0	0	32	construcción	secundaria	casado	Barru Vista	0	NR	ninguno	ninguno	ninguno	no	no			1	Negativo
CHINA	08-944	0	0	54	agrigator	tercer año	unido	Patruque	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-945	0	0	43	ayudante	secundaria	casado	Catshel	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo
CHINA	08-1946	1	0	60	ayudante	secundaria	casado	Puerto Pílan	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no				Negativo



## Resumen de Información Obtenida Mediante el Formulario de Recordación de Datos en el Banco de Sangre del Hospital CHMAAM

|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

	Número de entrevista	Sexo		Ocupación	Nivel escolar	Estado civil	Residencia	Tipo de conexión	Hábitos seculares	Baja de una persona trabajador	Bancos	Prestaciones no	Educativo de escolar trabajador	Vacuna para Hepatitis B			Estratificación del trabajador en las últimas 2 semanas	Resultado de Hepatitis B core
		M	F											1	2	3		
	Banco de Sangre																	
65	CHUAMAM	07-02015	0	24	electricista	secundaria	casado	Juan Diaz	0	Heterosexual	no	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
66	CHUAMAM	07-02017	0	46	seguridad	secundaria	casado	San Miguelito	0	NR	no	ninguno	no	no	no	no	no	negativo
69	CHUAMAM	07-02018	0	26	NR	secundaria	casado	Belisario porras	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no	no	no	negativo
70	CHUAMAM	07-02016	0	28	educador	secundaria	unido	Omar Toribio	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no	no	no	negativo
71	CHUAMAM	07-02020	1	0	conductor	secundario	unido	ben Curries	0	Heterosexual	no	NR	ninguno	no	no	no	si	negativo
72	CHUAMAM	07-02030	0	39	padre	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	si	NR	ninguno	no	no	no	si	negativo
73	CHUAMAM	07-02019	1	0	vendedor	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
74	CHUAMAM	07-02021	0	36	seguridad	secundaria	casado	la Chorrera	0	1	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
75	CHUAMAM	07-02002	0	54	seguridad	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
76	CHUAMAM	07-02023	0	29	seguridad	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
77	CHUAMAM	07-02007	0	48	hacer	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
78	CHUAMAM	07-02028	1	0	inspector	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
79	CHUAMAM	07-02011	0	44	inspector	secundaria	casado	ben Curries	0	1	Heterosexual	no	ninguno	no	no	no	no	negativo
80	CHUAMAM	07-03184	0	59	hogero	universitario	casado	califon	0	arrogancia	ninguno	ninguno	ninguno	no	no	no	no	SECTION NAOD
81	CHUAMAM	07-03185	1	34	vendedor	universitario	casado	San Miguelito	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	no	negativo
82	CHUAMAM	07-03188	0	43	seguridad	secundaria	unido	bocon	0	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	no	negativo
83	CHUAMAM	07-03183	0	5	hogero	secundaria	casado	bocon	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	si	negativo
84	CHUAMAM	07-03018	0	56	hogero	secundaria	unido	San Miguelito	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
85	CHUAMAM	07-03008	1	0	hogero	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
86	CHUAMAM	07-03009	0	71	hogero	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
87	CHUAMAM	07-03008	0	22	hogero	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
88	CHUAMAM	07-03002	0	24	hogero	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
89	CHUAMAM	07-03002	0	40	hogero	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
90	CHUAMAM	07-03048	1	0	conductor	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
91	CHUAMAM	07-02081	1	0	conductor	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
92	CHUAMAM	07-02015	0	36	conductor	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
93	CHUAMAM	07-02018	0	30	Independiente	secundaria	casado	Juan Diaz	0	1	Heterosexual	no	ninguno	ninguno	no	no	no	negativo
94	CHUAMAM	07-02000	0	7	medico	universitario	casado	la Chorrera	0	Heterosexual	si	ninguno	ninguno	no	no	no	no	negativo

## ANEXO No 14

Debido a la diversidad de respuestas esta variable se ordenó alfabéticamente. Están incluidas las respuestas de los encuestados en los cinco Bancos de Sangre

### Resumen de Variable Residencia

Residencia	Frecuencia	Porcentaje
alanje	1	0,3 %
alcalde díaz	3	0,9%
almirante	3	0,9 %
Ancon	1	0,3%
Ancón	1	0,3 /
arraján	4	1,2%
barrio Balboa	1	0,3 %
Barrio Colón	1	0,3%
barrio Norte	1	0,3%
Barrio Sur	5	1,5%
Belisario porras	2	0 6%
Bella vista	2	0 6%
Betania	3	0,9 %
boca de junco	1	0,3%
boca del monte	1	0,3 %
bocas islas	5	1,5 %
boquerón	5	1,5 /
boquete	2	0 6%
Buena Vista	4	1,2%
bugaba	11	3,2%
Burunga	1	0,3 %
calidonia	1	0,3 /
calle abajo	1	0,3 %
Calvario Bongo	1	0,3%
canquintu	1	0,3%
capira	3	0,9%
carrasquilla	1	0,3%
Cativá	10	2 9%
cauchero	1	0,3%
cerca de la escuela	1	0,3%
Changuinola	26	7 7 %
changuinola bda. La Luz	1	0,3%
changuinola cuad.B	1	0,3 %
changuinola El Silencio	1	0,3%
changuinola fca 12	2	0 6 %



## ANEXO No 14

changuimola fca 13	1	0,3%
changuimola fca 15	1	0,3%
changuimola fca 24	1	0,3%
changuimola fca 32	1	0,3%
changuimola fca 42	1	0,3%
changuimola fca 64	1	0,3%
changuimola fca 65	2	0,6%
changuimola fca33	1	0,3%
changuimola fca6	1	0,3%
changuimola fca 67	1	0,3%
Chiriquí	2	0,6%
Chorrera	2	0,6%
chorrillo	3	0,9%
colbita	1	0,3%
colón	5	1,5%
cricamola río manatí	1	0,3%
Cristóbal	7	2,1%
cuadrante baseline	1	0,3%
cusapín Río Caña	1	0,3%
Darién	1	0,3%
David	30	8,8%
divala	1	0,3%
dolega	6	1,8%
el empalme	1	0,3%
el empalme planta de molde	1	0,3%
el empalme barrio dulce	1	0,3%
el empalme Lincon Creek	1	0,3%
el silencio	2	0,6%
el valle de san isidro	1	0,3%
fca 12	1	0,3%
fca 12 El Puré	1	0,3%
fca 15	2	0,6%
fca 6	1	0,3%
fca 62	2	0,6%
fca 63	1	0,3%
fca 64	1	0,3%
fca 66	1	0,3%
finca 4	1	0,3%
finca 6	1	0,3%
finca 8	1	0,3%

## ANEXO No 14

Gómez	1	0,3%
guabito	1	0,3%
guabito fca 52	2	0 6 /
guabito fca 57	1	0,3 /
guabito puente blanco	1	0,3%
guabito la mesa	3	0,9 /
gualaca	1	0,3%
guarumal	1	0,3 /
José Domingo Espinar	1	0,3%
Juabo	1	0,3%
Juan Díaz	6	1 8 /
La Bervena	1	0,3 /
la Chorrera	4	1,2%
La Estrella	1	0,3 /
la mesa	1	0,3%
La pintada	1	0,3%
las Cumbres	4	1,2%
Las Lomas	7	2 1%
Limón	1	0,3 /
Los Algarrobos	1	0,3%
Los Anastacios	1	0,3 /
Luzón	1	0,3%
mañanitas	3	0,9 /
maría chiquita	1	0,3%
Natá	1	0,3 /
no tiene	4	1,2%
Nueva Providencia	1	0,3%
nuevo chorrillo	1	0,3%
nuevo tocumen	2	0 6%
Nvo. Arraijan	1	0,3%
Omar Torrijos	1	0,3 /
pacora	3	0,9 /
Palenque	1	0,3 /
pantanal	2	0 6%
parque lefebre	4	1,2%
pedregal	13	3 8 /
pilón	1	0,3%
playa leona	1	0,3 /
progreso Barrio Lindo	1	0,3 /
Pto Armuelles	1	0,3%

## ANEXO No 14

pueblo nuevo	1	0,3%
Puerto Plón	5	1,5 /
punta laurel	1	0,3%
renacimiento	1	0,3 %
Río Abajo	3	0 9%
Sabanitas	5	1,5%
Salamanca	1	0,3 %
san Carlitos	1	0,3 %
san Carlos	1	0,3%
san Félix	1	0,3%
san Isidro	1	0,3 /
san Juan	2	0 6%
San Miguelito	7	2 1 /
San Pablo	1	0,3 /
san puente	1	0,3 /
sixaola, Costa Rica	1	0,3 /
suiche 4	1	0,3 /
tocumen	7	2 1 /
Torrijos Carter	2	0 6 /
vacamonte	1	0,3 /
valle del risco	1	0,3%
Veraguas	2	0 6%
veranillo	1	0,3 %
villa carolina	1	0,3 /
vista alegre	2	0,6%
vokán	3	0,9%
<b>Total</b>	<b>339</b>	<b>100,0 /</b>

## **Anexo No 15**

### **Análisis Estadístico de la Variable Más de una Pareja Habitual y su Relación con el Numero de Unidades Anti HBc Positivas**

*H<sub>1</sub> El tener más de una pareja habitual es causal del alto numero de unidades anti HBc+*

*H<sub>0</sub> El tener más de una pareja habitual no es causal del alto numero de unidades anti HBc+*

Tenemos que segun Dankhe (1986) señala que los estudios descriptivos no suelen contener hipótesis y ello se debe a que en ocasiones es difícil precisar el valor que puede manifestar una variable

Sin embargo se utilizo la Escala de Actitudes del tipo Likert (Sampieri R, et al 2000 pag 255 256) para poder cuantificar esta variable En esta escala se le asigna un valor numérico a los diferentes objetos de actitud que se están midiendo Este tipo de escala se usa en investigaciones de comportamiento

1 Para el análisis de esta variable se asignaron valores arbitrarios a las diferentes respuestas

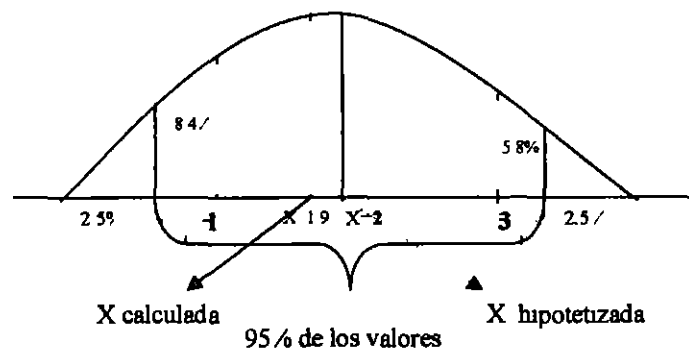
1 \_para los que No respondieron

2 para los que No tenían más de una pareja habitual

3 para los que Si tenían más de una pareja habitual

2 Una vez asignados los valores se ubican simbólicamente en una curva de distribución normal

**Gráfico 1**



3 Se establece un nivel de significancia de 0.5 (nivel convenido en ciencias sociales) la cual implica que el investigador tiene 95% de seguridad para generalizar sin equivocarse y solo 5% en contra. En términos de probabilidad 0.95 y 0.05 ambos suman la unidad. Esto se hace para definir si el resultado de la comparación de las variables es real y no debido a un error de muestreo (Sampieri R. et al 2000 pag 368-374)

4 Se establece una media que en este caso es igual a

$$X = \frac{\text{Sum } fx}{N}$$

Donde X= media

Sum fx= sumatoria de la frecuencia por el valor asignado

N= tamaño de la muestra

Veamos la siguiente tabla

**Tabla 1 Análisis Estadístico de la Variable Más de una Pareja Habitual.**

<b>Respuestas a la Variable Más de una Pareja Habitual</b>	<b>VALOR ASIGNADO (x)</b>	<b>FRECUENCIA (f)</b>	<b>fx</b>	<b>fx<sup>2</sup></b>
NO	2	291	582	338 724
SI	3	20	60	3 600
NR	1	28	28	784
<b>SUMATORIA (Sum)</b>		<b>339</b>	<b>670</b>	<b>343 108</b>

$$X = \frac{\text{Sum } fx}{N}$$

$$X = \frac{670}{339}$$

$$X = 1.9$$

- 1 Se determina la desviación estándar que es el promedio de desviación de los valores con respecto a la media Es igual a

$$S = \sqrt{\frac{\text{Sum } fx^2}{N} - X^2}$$

$$\text{Reemplazando } S = 28.2$$

- 2 Una vez determinado el nivel de significancia, la media poblacional y la desviación estandar para saber si nuestra hipótesis es aceptada o rechazada estimamos la desviación estándar de la distribución muestral de la media, utilizando la fórmula

$$S_x = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Reemplazando } S_x = 1.53$$

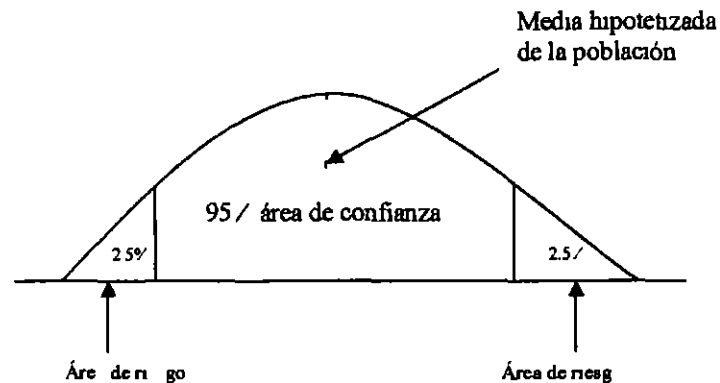
Donde  $S_x$  = desviación estándar de la distribución muestral de la media

$S$  = desviación estándar de la muestra

$n$  = tamaño de la muestra

7 Ahora debemos transformar la media de la muestra en una puntuación  $z$  en el contexto de la distribución muestral. Con una variación de la fórmula para obtener puntuaciones  $z$ . Las puntuaciones  $z$  son distancias que indican áreas bajo la distribución normal. En este caso áreas de probabilidad (Sampieri R et al 2000 pag 363)

**Gráfico 2**



$$Z = \frac{x - \bar{x}}{S_x}$$

Donde  $\bar{x}$  = media de la muestra

$x$  = media hipotetizada de la distribución muestral

$S_x$  = desviación estándar de la distribución muestral

$$Z = \frac{1.920}{1.53}$$

$$Z = 0.065$$

8 Este valor se compara con el valor 1.96 que se toma siempre que el nivel de significancia es 0.05 ( $z=1.96$ )

Entonces se compara la media de la muestra transformada a puntuación  $z$  con el valor 1.96 si es menor se acepta la hipótesis y si es mayor se rechaza

Valor calculado de  $z = 0.065 < 1.96$

Por tanto se acepta la hipótesis de investigación a un nivel de significancia del .05 (95% a favor y 5% de riesgo de cometer un error)

En conclusión se acepta la  $H_1$  en donde se propone que la Variable Mas de una Pareja Habitual contribuye al alto numero de unidades anti HBc+ y se rechaza la  $H_0$  que propone que la variable Mas de una Pareja Habitual no es causal del alto numero de unidades anti HBc+